Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A.M. Kellerer

RADIOIMMUNOASSAY VON PANKREATISCHEM GLUKAGON. VERBESSERUNG DER METHODIK UND ANWENDUNG ZUR ERMITTLUNG DER ROLLE VON GLUKAGON IM POLYTRAUMA

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und dem
Fachbereich Medizin
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jürgen Schrezenmeir
aus Würzburg

27. Juli 1979

1980

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A.M. Kellerer

RADIOIMMUNOASSAY VON PANKREATISCHEM GLUKAGON. VERBESSERUNG DER METHODIK UND ANWENDUNG ZUR ERMITTLUNG DER ROLLE VON GLUKAGON IM POLYTRAUMA

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und dem
Fachbereich Medizin
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Jürgen Schrezenmeir
aus Würzburg

27. Juli 1979

Referent: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. K. HEMPEL

Korreferent: Prof. Dr.med. H.A. KÜHN

Dekan: Prof. Dr.med. O. SCHRAPPE

Tag der mündlichen Prüfung: 29.1.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der
Universität Würzburg

M E I N E R L I E B E N F R A U

U N D

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0003

INHALTSVERZEICHNIS

I. RADIOIMMUNOASSAY

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Glukagon und seine Bestimmung	1
1.2	Spezielle Probleme bei der radioimmunologischen Bestimmung von Plasma-Glukagon	1
1.3	Aufgabenstellung der Arbeit	1
1.3.1	Präparation von ^{125}J-Glukagon	2
1.3.1.1	Jodierung von Glukagon	2
1.3.1.2	Reinigung von ^{125}J-Glukagon	2
1.3.2	Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera	3
1.3.2.1	mit ausreichender Sensitivität	3
1.3.2.2	mit ausreichender Spezifität	4
1.3.3	Untersuchung der unspezifischen Effekte	6
2.	MATERIAL	8
3.	METHODIK	10
3.1	Präparation von ^{125}J-Glukagon	10
3.1.1	Jodierung von Glukagon	10
3.1.2	Reinigung von ^{125}J-Glukagon	12
3.1.2.1	mit Quso G 32	12
3.1.2.2	mit Sephadex G 25-Säulenchromatographie	12
3.1.2.3	mit QAE-Sephadex A 25-Säulenchromatographie	13
3.1.3	Papierelektrophorese der ^{125}J-Glukagon-Präparation	
3.1.3.1	Kontrolle des Reinigungserfolgs	14
3.1.3.2	Berechnung der spezifischen Aktivität des ^{125}J-Glukagons	14
3.2	Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera	16
3.2.1	Antigenzubereitung	16
3.2.2	Applikation des Antigens	17
3.2.3	Serumgewinnung	17
3.2.4	Kontrolle der Serumeigenschaften	18
3.2.4.1	Bindungskapazität	18
3.2.4.2	Affinität bzw. Sensitivität	18
3.2.4.3	Spezifität	21

3.3	Präparation von Plasmaproben zur radio-immunologischen Bestimmung von Glukagon	22
3.3.1	Plasmagewinnung	22
3.3.2	Plasmaextraktion	22
3.4	Radioimmunoassay-Prozedur	23
3.4.1	Inkubationsbedingungen	23
3.4.1.1	Assay-Diluent	23
3.4.1.2	Temperatur	23
3.4.1.3	Inkubationszeit	24
3.4.1.4	Typischer Ansatz	24
3.4.2	Trennung von Ak-gebundenem und freiem Glukagon	25
3.4.2.1	Holzkohlentrennung	25
3.4.2.2	Alkoholfällung	26
4.	ERGEBNISSE	27
4.1	Präparation von ^{125}J-Glukagon	27
4.1.1	Jodierung - Austestung optimaler Bedingungen	27
4.1.1.1	Abhängigkeit von Chloramin-T-Konzentration und Reaktionsdauer	30
4.1.1.2	Abhängigkeit vom pH-Wert	30
4.1.2	Reinigung von markiertem Glukagon - 3 Methoden im Vergleich	32
4.1.2.1	Charakteristik der Aktivitätsverteilung nach Reinigung	32
4.1.2.1.1	Sephadex G 25 - Säulenchromatographie	32
4.1.2.1.2	QAE Sephadex A 25 - Säulenchromatographie	35
4.1.2.1.3	Quso G 32 - batch-Verfahren	38
4.1.2.2	Gütevergleich der 3 Verfahren	38
4.1.2.2.1	mittels Elektrophorese	38
4.1.2.2.2	mittels immunologischer Testung	38
4.1.2.3	Charakterisierung der Güte des Quso gereinigten ^{125}J-Glukagons	41
4.2	Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera	43
4.2.1	Antigenzubereitung	43
4.2.2	Serumeigenschaften	46
4.2.2.1	Einfluß der Art des Immunogens	46
4.2.2.1.1	auf Titerverhalten	46
4.2.2.1.2	auf die Sensitivität	
4.2.2.2	Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme nach Impfung	49

		Seite
4.2.3	Eigenschaften des Serums G 18 bzw. G 19	49
4.2.3.1	Ak-Verdünnungskurve	49
4.2.3.2	Einfluß der Inkubationszeit	49
4.2.3.3	Standardkurve - Sensitivität	54
4.2.3.4	Scatchard plot - Affinität	54
4.2.3.5	Spezifität	54
4.3	Präparation der Plasmaproben zur radioimmunologischen Bestimmung - Plasmaextraktion	55
4.3.1	Effizienz und Reproduzierbarkeit	55
4.3.2	Immunologische Integrität des extrahierten Glukagons	55
4.4	Radioimmunoassay-Prozedur Bedingungen bei Inkubation und Trennung von gebundenem und freiem Glukagon - Unspezifische Effekte durch Albumin- und Holzkohlenkonzentration	58
4.5	Bestimmung von Plasmaglukagon am Beispiel des Pankreozymin-Cholecystokinin-Stimulierungsversuchs	64
5.	DISKUSSION	65
5.1	Präparation von ^{125}J-Glukagon	65
5.1.1	Jodierung	65
5.1.2	Reinigung von ^{125}J-Glukagon	66
5.2	Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera	67
5.2.1	Antigenzubereitung	67
5.2.2	Serumeigenschaften	68
5.2.2.1	Einfluß der Art des Immunogens	68
5.2.2.1.1	auf das Titerverhalten	68
5.2.2.1.2	auf die Sensitivität	68
5.2.2.2	Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme nach Impfung	68
5.2.2.3	Die Sera G 18 und G 19 im Vergleich zu K 964	69
5.2.2.3.1	Ak-Verdünnungskurve (Bindungskapazität)	69
5.2.2.3.2	Inkubationszeit (Avidität)	69
5.2.2.3.3	Standardkurve (Sensitivität)	69
5.2.2.3.4	Scatchard plot (Affinität)	69
5.2.2.3.5	Spezifität (Kreuzreaktivität)	70
5.3	Unspezifische Effekte	71
5.3.1	Holzkohlentrennung - Abhängigkeit von Holzkohlen- und Albuminkonzentration	71
5.3.1.1	Bedeutung von geschädigten ^{125}J-Glukagon	72

Seite

5.3.1.2 Bedeutung der Adsorption von AgAk-Komplex an Holzkohle 73
5.3.2 Alkoholfällung 75
5.4 Plasmaglukagon nach Cholecystokinin-Stimulierung 76

II. GLUKAGON-PLASMASPIEGEL BEI POLYTRAUMATISIERTEN 78

1. EINLEITUNG 78
1.1 Glukagon - ein Stresshormon 78
1.2 Ziel der Studie 79
2. MATERIAL UND METHODIK 81
2.1 Patientengut 81
2.2 Ablauf der Untersuchungen 82
2.3 Therapeutische Maßnahmen im Untersuchungszeitraum 82
2.4 Bestimmungsmethoden 83
3. ERGEBNISSE 86
3.1 Blutbild 86
4.1.1 Leukozyten 86
3.1.2 Erythrozyten 88
3.1.3 Hämoglobin 88
3.1.4 Hämatokrit 88
3.1.5 HbE - mittlerer Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten 88
3.2 Wasser- und Elektrolythaushalt 88
3.2.1 Natrium 88
3.2.2 Kalium 88
3.2.3 Calcium 90
3.2.4 Kreatinin 90
3.3 Säure-Base-Haushalt 90
3.3.1 pH-Wert 90
3.3.2 Base-Excess 92
3.3.3 Sauerstoffpartialdruck 92
3.3.4 Kohlendioxydpartialdruck 92
3.4 Stoffwechselparameter 92
3.4.1 Glukose 92
3.4.2 Cholesterin 92

		Seite
3.4.3	Triglyceride	92
3.4.4	Gesamteiweiß	93
3.4.5	Albumin	93
3.4.6	Harnstoff-N	93
3.5	Hormone	96
3.5.1	Glukagon	96
3.5.2	Insulin	96
3.5.3	Adrenalin	96
3.5.4	Noradrenalin	98
3.5.5	Cortisol	98
4.	DISKUSSION	99
4.1	Glukagonspiegel - Vergleich mit Untersuchungen anderer Autoren	99
4.2	Beziehung zu modulierenden Parametern	101
4.2.1	Glukose	101
4.2.2	Aminosäuren	102
4.2.3	Lipide	104
4.2.4	Elektrolyte	105
4.2.5	Sympathikoadrenerges System	105
4.2.6	Glukocorticoide	108
4.2.7	Hämokonzentration und -dilution	109
4.2.8	Minderperfusion Glukagon-eliminierender Organe	109
4.2.9	Die Rolle von Schock, Schmerz, Trauma-Versuch einer Aufschlüsselung der Stressfaktoren	110
4.3	Beziehung zu Effektoren des Glukagons	111
4.3.1	Glukose	111
4.3.2	Lipide	111
4.3.3	Proteine	112
4.3.4	Kalium	113
4.3.5	Insulin	113
4.4	Hyperglukagonämie im Trauma - Nutzen oder Schaden	114
4.4.1	Stoffwechsel	114
4.4.2	Hämodynamik	114
5.	ZUSAMMENFASSUNG	116
6.	LITERATURVERZEICHNIS	I - XXVI
7.	ABKÜRZUNGEN	XXVII

1. EINLEITUNG

1.1 Glukagon und seine Bestimmung

Glukagon, ein Peptidhormon aus 29 Aminosäuren mit einem MG von 3483, wurde durch Murlin und Mitarbeiter 1923 als hyperglykämischer Faktor in rohen Insulin-Präparationen entdeckt.
Dreißig Jahre später wurde Glukagon durch Staub et al. (1953) gereinigt und kurz darauf die Aminosäure-Sequenz durch Bromer et al. (1957) aufgeklärt.
Die Bedeutung als Hormon wurde erst mit der Ära des Radioimmunoassays erfaßbar, welche durch Berson und Yalow 1959 und 1960 eingeleitet wurde.
Obwohl der erste Bericht über einen RIA für Glukagon (Unger et al. 1959) kurz nach der Einführung der Technik veröffentlicht wurde, ergaben sich größere Schwierigkeiten als für Insulin, eine Methode genügender Sensitivität und Spezifität zu entwikkeln, um die Konzentration von Glukagon im Plasma zu bestimmen.

1.2 Spezielle Probleme bei der radioimmunologischen Bestimmung von Plasma-Glukagon

Die Hauptschwierigkeiten beim Glukagon sind:

1. die Herstellung eines "intakten" ^{125}J-Glukagons;
2. die Produktion ausreichend sensitiver Antiseren, die es gestatten, Glukagon-Spiegel im Plasma zu messen - Glukagon selbst ist ein schwaches Antigen;
3. die Erzeugung spezifischer Antiseren, die mit Enteroglukagon und Glukagon-ähnlichen anderen Hormonen nicht reagieren;
4. Störeffekte durch unspezifische Proteinbindung im Assay.

1.3 Aufgabe der Arbeit war,

I. den Assay für Glukagon so empfindlich und spezifisch zu machen, daß das pankreatische Glukagon in Blut gemessen werden konnte und
II. die Anwendung dieses RIA's bei einer klinischen Fragestellung.

1.3.1 Präparation von ^{125}J-Glukagon

1.3.1.1 Jodierung von Glukagon

Die Herstellung von ^{125}J-Glukagon erfolgt in der Regel nach der Chloramin-T-Methode (Hunter u. Greenwood, 1962). Dabei wird ein Teil des Hormons geschädigt. Die Eliminierung dieses Anteils erfordert aufwendige Reinigungsverfahren. Das Ausmaß der Schädigung hängt von der Chloramin-T-Konzentration und vom pH-Wert ab. Für andere Hormone sind zum Teil scharf definierte Optima der Reaktionsbedingungen gefunden worden (Gregory u. Tracy, 1964; Hunter, 1966), die eine Reduzierung der Schädigung herbeiführen. Da für Glukagon bisher Studien dieser Art nicht vorliegen, testeten wir verschiedene Bedingungen der Reaktion.

1.3.1.2 Reinigung von ^{125}J-Glukagon

Zur Reinigung des ^{125}J-Glukagons, d.h. zur Eliminierung von überschüssigem ^{125}J-Jodid und von geschädigtem Glukagon, wurden mehrere Verfahren angewendet (s. Tab.1). Die Methoden, welche einen hohen Reinheitsgrad erbringen, sind relativ aufwendig und zeitraubend. Am meisten durchgesetzt haben sich die Säulenchromato-

Tab.1: ^{125}J-Glukagon-Reinigung

Verfahren	Immunreaktivität	Elektrophoretische Reinheit	Autoren
Zellulose-Säule	ca. 80%	geschädigter Anteil noch nachweisbar (? %)	Lawrence, 1966 Hazzard et al., 1968 Shima u. Foa, 1968 (Nonaka u.Foa,1969)
AK-Bindung und Dissoziation	93%	? %	Schopman et al., 1967
Sephadex G 25	ca. 80%	? %	Edwards et al.,1970a Lundquist, 1976
Aussalzen mit NaCl	? %	? %	Heding, 1971
Äthanol-Extraktion		5% geschädigtes ^{125}J-Glukagon	Heding, 1971
QAE Sephadex A 25	96%		Jørgensen u. Larsen, 1972

graphie mit dem Molekularsieb Sephadex G 25 und dem Ionenaustauscher QAE Sephadex A 25. Deshalb verglichen wir diese beiden Methoden mit einem von uns entwickelten Schnellverfahren, bei dem ^{125}J-Glukagon durch Adsorption an Quarzstaub (Quso G 32) gereinigt wird.

1.3.2 Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera

1.3.2.1 mit ausreichender Sensitivität

Um die Immunantwort auf das schwache Antigen Glukagon zu verstärken, verwendete man 1. Adjuvantien, 2. Adsorption bzw. chemische Kopplung an größere Moleküle. Eine Übersicht liefert Tabelle 2.

Tab.2: Erzeugung von Glukagon-Antiseren

Glukagon und Adjuvans	Unger et al., 1959
Alum-Präzipitiertes Glukagon-Hühner-albumingemisch	Probst u.Colwell,1966 (zit.nach Heding,1972)
Polyvinyl-pyrrolidon-adsorbiertes Glukagon	Assan et al., 1965
Albumin-gekoppeltes Glukagon (Carbodiimid-Kopplung)	Assan et al., 1965
Glukagon-Polymere (Carbodiimid-Kopplung)	Heding, 1969
Poly-L-Lysin-gekoppeltes Glukagon	Cuatrecasas u. Illiano, 1971
Hämozyanin- bzw. Albumin-gekoppelt (Benzidin-Kopplung)	Senyk et al., 1971 u. 1972
Thyreoglobulin-gekoppeltes Glukagon (Glutaraldehyd-Kopplung)	Schenk, 1977

Von diesen Präparationen haben zu brauchbaren Ak-Titern und erforderlicher Sensitivität für die Plasma-Glukagonbestimmung geführt:

1. Polyvinyl-adsorbiertes Glukagon	Assan et al., 1965
2. Albumin-gekoppeltes Glukagon; Carbodiimid-Kopplung	Holst, 1974
3. Glukagon-Polymer; Carbodiimid-Kopplung	Heding, 1969
4. Thyreoglobulin-gekoppeltes Glukagon; Glutaraldehy-Kopplung	Schenk, 1977

Nach den im Schrifttum vorliegenden Daten ist die Erfolgsquote von Heding am höchsten.

Leider sind die Angaben von Heding zur Methodik der Kopplung für ein exaktes Nacharbeiten ihrer Versuche zu unvollständig, so daß wir verschiedene Polymerisierungsbedingungen erneut austesten mußten. Zur Kopplung verwendeten wir ebenfalls Carbodiimid, ein Reagenz, das von Sheehan u. Hess, 1955, als Reagenz für die Proteinsynthese angegeben und von Goodfriend et al., 1964, in die Immunologie eingeführt wurde.

1.3.2.2 mit hoher Spezifität

Die Spezifität, die der Ak-Ag-Reaktion zugute gehalten wird, ist bestimmt durch Art des Reaktionszentrums des Ak. Peptide mit Teilstücken gleicher oder ähnlicher Aminosäuresequenz können mit ein und demselben Ak "kreuzreagieren", wenn sich dessen antigene Determinante gegen die gemeinsamen Teilstrecken richtet.

Wie sich gezeigt hat, reihen sich die Mehrzahl der gastrointestinalen Peptidhormone in eine von zwei ontogenetisch gewachsenen Peptidfamilien ein, nämlich die der Cholecystokinin- und die der Glukagon-ähnlichen Hormone (s. Tab.3). Ein Ak, der durch Immunisation mit Glukagon gewonnen wurde, kann also mit einer Anzahl von Hormonen kreuzreagieren. Dazu zählen neben charakterisierten Hormonen (Tab. 3a) auch solche, die noch unter den Begriff "Glukagon" fallen (s. Tab. 3b), weil ihre exakte Charakterisierung und eventuelle Abtrennung durch chemische und biologische Analyse bislang nicht gelungen ist und die weitaus überwiegende Zahl der Antiseren gegen Glukagon mit ihnen reagieren.

Nur eine sehr geringe Anzahl von Antiseren konnte entwickelt werden, welche ausschließlich mit sogenanntem "echtem", aus Pankreas isoliertem Glukagon reagieren (Eisentraut et al., 1968; Heding, 1969; Holst u. Aasted, 1974; Schenk, 1977). Diese wurden als sogenannte "spezifische" Seren bezeichnet. Sie sind offenbar gegen den carboxyterminalen Teil von Glukagon gerichtet (Assan u. Slusher, 1972; Faloona, 1972; Holst, 1977).

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu finden, die die Chance vergrößert, spezifische Glukagon-Antiseren zu produzieren.

Tab.3: Die Glukagon-Familie intestinaler Hormone

Tab.3a: Hormone mit definierter Aminosäuresequenz und Wirkung

Glukagon	echtes Glukagon
Sekretin	
GIP	gastric inhibitory polypeptide
VIP	vasoactive intestinal peptide

Tab.3b: "Glukagon"-Begriffe und Definitionen modifiziert nach Holst, 1978

	Synonyme	Definition
Glukagon	echtes Glukagon	Peptid aus 29 Aminosäuren, bekannte Sequenz, MG 3485 ursprünglich aus dem Pankreas extrahiert, offenbar jedoch auch extrapankreatisch vorkommend (Larsson et al., 1975; Dobbs et al.,1975; Mashiter et al., 1975; Matsuyama u. Foa, 1974; Morita et al., 1976)
GLI	glucagon-like-immuno-reactivity	Jedes Peptid, welches mit sogenanntem "unspezifischen" Ak reagiert, welche durch Glukagon-Immunisierung gewonnen wurden.
PTG	pancreatic-type glucagon pankreatisches Glukagon	Peptide, die von sog. "spezifischen" Ak gebunden werden, die keine Kreuzreaktion mit GTG's zeigen und gegen den carboxyterminalen Teil von Glukagon gerichtet sind.
GTG	gut-type glucagon Enteroglukagon Darm-Glukagon gut GLI	Peptide, die nicht von "spezifischem" Ak gebunden werden; immunologisch gleich GLI-I; bisher mind. 4 Komponenten
GLI-I	Glicentin hochmolekulares GTG	eine hochgereinigte GTG-Komponente, Aminosäurezusammensetzung bekannt, MG 11625

1.3.3 Unspezifische Effekte

Unter diesem Begriff werden jene Parameter zusammengefaßt, die eine Veränderung der spezifischen Ag-Ak-Interaktion bewirken oder vortäuschen. In Betracht kommen:

Temperatur	(Chard et al., 1971)
pH	(Yalow u. Berson, 1971)
Osmolalität	(Yalow u. Berson, 1971; Hurn u. Landon, 1971; Heding, 1971)
Harnstoff	(Girard u. Greenwood, 1968)
Calciummangel	(Hunter et al., 1971; Nakamura, 1971)
Heparin	(Yalow u. Berson, 1971)
Proteine	(Hurn u. Landon, 1971; Glazer, 1970; Unter u. Eisentraut, 1967; Weir et al., 1973)
biologisch inaktive Fragmente	(Aubert u. Lemarchand-Beraud, 1971)
chemisch verwandte Substanzen	(")
Immunisierung mit unreinen Substanzen	(")
geschädigtes ^{125}-Glukagon	(Yalow u. Berson, 1971)

Während die meisten Störfaktoren durch die Wahl eines geeigneten Milieus eliminiert werden können, bereiten die unspezifische Proteinbindung und die Schädigung des Glukagons durch die Jodierung immer noch methodische Schwierigkeiten.

Diese unspezifischen Effekte wirken sich unterschiedlich aus für die verschiedenen Hormone und Trennungsmethoden von freiem und Ak-gebundenem Ag (Hunter u. Ganguli, 1971).

Von der Vielzahl der Methoden haben sich für Glukagon unter diesem Gesichtspunkt behauptet:

1. die Alkoholfällung,
2. die Holzkohlentrennung.

Bei der Alkoholfällung stören zwar die Proteine des Plasmas beträchtlich (Buchanan u. Mc Carroll, 1971), durch die vorherige Alkoholextraktion des Glukagons aus dem Plasma eliminiert man jedoch nach Heding (1971) das Proteinproblem endgültig.

Die Trennung mit dextranbeschichteter Holzkohle wird wegen der Möglichkeit empfohlen, Plasmahormonspiegel direkt zu messen mit einem Minimum an unspezifischen Effekten gegenüber anderen Methoden (Herbert et al., 1965).

Für Glukagon wurden jedoch auch bei dieser Methode zum Teil starke Proteineffekte gefunden (Luyckx, 1972; Buchanan u. Mc Carroll, 1971). Da die verschiedenen Untersucher (Buchanan u. Mc Carroll, 1971; Luyckx, 1972; Leclerq-Meyer et al., 1970; Unger, 1974) zu teilweise sich widersprechenden Ergebnissen kamen, stellten wir eigene Untersuchungen an über den Effekt von Proteinen im von uns verwendeten System.

2. MATERIAL

Glukagon	
kristallin vom Schwein und Rind	Sigma, München
kristallin vom Schwein	Eli Lilly, Indianapolis, Lot No.258 - D 30 -138 4 Insulin-Gehalt 0.000 0025 %
"highly purified" vom Schwein	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
Enteroglukagon I	Novo
Gastric inhibitory polypeptide (GIP)	Karolinska-Institut, Stockholm
Vasoactive intestinal peptide (VIP)	Karolinska-Institut, Stockholm
Sekretin (synthetisch)	Karolinska-Institut, Stockholm
Cholecystokinin	Boots, Nottingham, England
125 - Jodine	
Im V-Gefäß, hochkonzentriert (100 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
Im V-Gefäß, hochkonzentriert (100 mCi/ml)	NEN, Dreieichenhain in ca. 0,1 N NaOH gelöst Radiochem. Reinheit 99% Radionuklid-Reinheit 99% Spezifische Aktivität: trägerfrei
Quso G 32	Quartz-Company, Philadelphia
Trasylol^{R} (Aprotinin)	
als Trockensubstanz	Bayer, Leverkusen, zur Vorbereitung der Blutproben
in Ampullenform	Bayer, Leverkusen, zur Herstellung der Inkubationslösungen
Human-Albumin, reinst.	Behring, Marburg
Bovines Plasma Albumin	Behring, Marburg
Thimerosal (Äthyl-Quecksilber-Thiosalicylat)	Sigma, München
Norit (Holzkohle)	Fisher, Zürich
Komplettes Freund'sches Adjuvans	Behring, Marburg

1-Äthyl-3(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid-HCl	Sigma, München
Elektrophoresepapier SS 2043	Schleicher u. Schüll, Dassel
RIA-Gefäße aus Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht
Viskin Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg

Ausschlußvolumen von 10.000 bis 20.000 MG

Die Readioaktivität des ^{125}J der Proben wurde in einem Szintillationszähler (Typ Gammaszint BF 5300 von Fa. Berthold) gemessen, die Radioaktivität auf den Elektrophoresestreifen in einem Packard Radiochromatogram Scanner, Model 7201.

3. METHODIK

Der RIA setzt sich aus folgenden Teilschritten zusammen:

1. Präparation von ^{125}J-Glukagon,
2. Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera,
3. Erstellen einer Standardkurve mittels bekannter Glukagonmengen,
4. Aufbereitung von Plasmaproben zur Glukagonspiegelbestimmung,
5. RIA-Prozedur.

Eine Übersicht gibt das Flußschema.

3.1 Präparation von ^{125}J-Glukagon

3.1.1 Jodierung

Die Jodierung des Glukagons basiert auf der Methode von Hunter u. Greenwood, die für die Jodierung des Wachstumshormons (STH) angegeben haben (Hunter u. Greenwood, 1962; Greenwood et al., 1963). Nach Austestung der Reaktion in Abhängigkeit von der Chloramin T-Konzentration, der Reaktionszeit und dem pH Wert des Milieus (s.u. Ergebnisse), behielten wir folgendes Schema bei:

Bei Zimmertemperatur wurden in ein Reagenzröhrchen nacheinander pipettiert:

10 µl Na-Phosphat-Puffer (0,5 M, pH 7,0)
5 µl 125-Jodine = 0,5 mCi
10 µl Glukagon (0,08 mg/ml verdünnte H_2SO_4, pH 2,5)
5 µl Chloramin T (1 mM in 0,25 M Na-Phosphat-Puffer)

nach 60 sec. Abbruch der Jodierung durch Zugabe von

20 µl Na-Metabisulfit (16,9 mg $Na_2S_2O_5$ in 100 ml 0,25 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0)
500 µl Humanalbumin - KJ-Lösung (100 mg Albumin + 8 mg KJ + 60000 KIE Trasylol in 1 ml H_2O
10 µl "ungereinigtes ^{125}J-Glukagon" zur Elektrophorese entnommen

Radioimmunoassay

(Flußschema)

Präparation von ^{125}J-Glukagon

Markierung von Glukagon mit ^{125}J (Chloramin-T-Reaktion)

↓

Abtrennung von anorganischem ^{125}J und Reinigung des ^{125}J-Glukagons

↓

Einstellen der Konzentration mit "Phosphat Puffer"

↓

[^{125}J-Glukagon] in 100µl "Phosphat-P." + [Antiserum-Verdünnung] 100 µl

Antikörper-Gewinnung

Polymerisierung von Glukagon

↓

Injektion des Polymers bei Kaninchen

↓

Serumgewinnung nach 10 Tagen

↓

Durchführung des Assays

↓

Standard

Glukagon in "Phosphat-Puffer"

↓

Nach 24 h:

Zugabe von Glukagon bekannter Konzentration (=Standardverdünng.)

oder von [Glukagon] unbekannter Konzentration (= Plasmaprobe)

100 µl

↑

Vorbereitung der Blutprobe

Wiederlösen in "Phosphat-Puffer"

↑

↓ Plasmaextraktion mit Äthanol

↑

Plasma

↑

10 ml Blut in Röhrchen mit 5000 KIE Trasylol und 12 mg EDTA

Nach 48 h:

[Trennung des ungebundenen Glukagons/^{125}J-Glukagons vom Ak-gebundenen]

durch Äthanolfällung od. durch Holzkohlentrennung

Zählen der cpm des ^{125}J-Glukagons im Überstand und im Sediment

3.1.2 Reinigung

Zur Abtrennung von ^{125}J-Jodid und geschädigtem ^{125}J-Glukagon wurden drei Verfahren verglichen:

1. Quso G 32 - batch - Verfahren, das von uns erstmals auf den Glukagon-RIA angewendet wurde,
2. Sephadex G 25 - Säulenchromatographie nach Edwards u. Taylor (1970),
3. QAE Sephadex A 25 - Säulenchromatographie nach Jørgensen u. Larsen (1972).

3.1.2.1 Quso

Die Trennung beruht auf Adsorption des Glukagons an mikrofeines Silicat (Quso G 32). Sie wurde nach einer Modifikation der Methode von Yalow u. Berson (1966) durchgeführt:

6 mg Quso 32 wurden zu 550 µl ungereinigtem ^{125}J-Glukagon (3.1.1) gegeben

15 min Adsorption bei 20° unter mehrmaligem Aufrühren der Suspension mit dem Vortex

Zentrifugation (800 g, 3 min, 20°)

Dekantieren des Überstandes (= "$Ü_1$")

Zugabe von 2 ml Waschlösung (1 mg NaJ/ml H_2O)

Aufrühren der Suspension mit dem Vortex

Zentrifugation

Dekantieren des Überstandes "$Ü_2$"

2 ml Waschlösung

Erneutes Aufrühren und Zentrifugieren und

Dekantieren "$Ü_3$"

Ablösen des ^{125}J-Glukagons mit 1 ml Mercaptoäthanol-Aceton-Essigsäure-Lösung (20 ml Aceton + 1 ml Essigsäure + 76,5 ml H_2O + 3,5 ml Mercaptoäthanol)

15 min einwirken lassen unter mehrmaligem Aufrühren

Zentrifugieren (750 g, 5 min, 21°)

Abpipettieren des Überstandes "$Ü_4$"

3.1.2.2 Sephadex G 25 - Säulenchromatographie

Die Reinigung beruht auf dem Molekularsiebeffekt von Sephadex G 25.

Säule	0,9 x 52 cm (Pharmacia)
Sephadex G 25	fine (Pharmacia)
Auftragevolumen	0,1 ml
Elutionsmittel	"Assay Diluent" (s. unter Assay Prozedur)
Flußrate	13 ml/h
Fraktionsvol.	1,2 ml

Die Radioaktivität von je 0,01 ml dieser Fraktionen wurde im Szintillationszähler bestimmt.

3.1.2.3 QAE Sephadex A 25 - Säulenchromatographie

Die Reinigung beruht auf dem Prinzip des Anionenaustausches und auf dem Molekularsiebeffekt.

Säule	0,9 x 28 cm (Pharmacia)
QAE-Sephadex A 25	fine (Pharmacia)
Auftragsvolumen 0,3 ml	(zur Lösung nach der Markierung war anstatt 500 µl Humanalbumin-KJ-Lösung 500 µl 1 % KJ + 5 µl 2 M Tris + 1 ml Eluat zugegeben worden)
Elutionsmittel	0,08 M Tris, 0,02 N HCl, 0,08 M NaCl
pH	8,6
Flußrate	6,7 ml/h
Fraktionsvol.	2,7 ml

Die Radioaktivität von je 0,1 ml dieser Fraktionen wurde im Szintillationszähler bestimmt.

3.1.3 Elektrophorese

Die Papierelektrophorese des "ungereinigten ^{125}J-Glukagons" und der Überstände "$Ü_1$" - "$Ü_4$" bzw. der Fraktionen aus der Säulenchromatographie diente zur Kontrolle der Güte des ^{125}J-Glukagons (Shima u. Foa, 1968) und zur Ermittlung der spezifischen Aktivität über die Relation von ^{125}J-Glukagon zu ^{125}Jodid.

Folgende Bedingungen wurden gewählt:

Puffer	Na-Barbital-HCl-Puffer (pH 8,6, 0,1 M) (Na-Barbital = 5,5 Diäthylbarbitursäure, Natriumsalz)
Träger	Papier (4,5 cm x 20 cm) SS 2043 mgl (Fa. Schleicher u. Schüll, BRD)

Spannung	30 V/cm
Stromstärke	25 mA
Laufzeit	12 min oder mehr
Aufgetragenes Volumen	10 µl

Nach Trocknung der Streifen wurde die Aktivitätsverteilung im Scanner gemessen; der Elektrophoresestreifen des ungereinigten ^{125}J-Glukagons wurde außerdem in 0,5 cm breite Streifen zerschnitten und diese im Gamma-Zähler gemessen. Abb.1 zeigt die Aktivitätsverteilung der Elektrophoresestreifen einer Serie von ungereinigtem ^{125}J-Glukagon und "$Ü_1$" - "$Ü_4$".

3.1.3.1 Kontrolle der Güte des ^{125}J-Glukagons

Maximal 3 Peaks ließen sich unterscheiden (Shima u. Foa, 1968):

1. ^{125}Jodid wanderte zum positiven Pol mit der größten Geschwindigkeit.
2. Ungeschädigtes ^{125}J-Glukagon blieb am Start liegen.
3. Geschädigtes ^{125}J-Glukagon wanderte wie das ^{125}J-Jodid zum positiven Pol, nur mit geringerer Geschwindigkeit, nämlich mit der Albumin-Bande.

3.1.3.2 Berechnung der spezifischen Aktivität des ^{125}J-Glukagons und Einstellung der ^{125}J-Antigen-Lösung

Aus den Peaks des sog. "ungereinigten ^{125}J-Glukagons" wurden die relativen Anteile der Radioaktivität des ^{125}J-Jodid und des

---

Abb.1: Reinigung von ^{125}J-Glukagon durch Adsorption an Quso G 32.
Reinheitskontrolle durch Papierelektrophorese (s.3.1.3)

a) Vor Zugabe des Quso G 32.
^{125}J-Jodid und ungereinigtes ^{125}J-Glukagon nachweisbar.

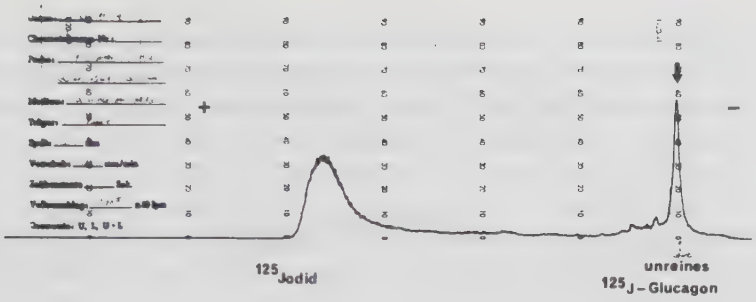
b) Überstand 1 bzw. $Ü_1$. ^{125}J-Glukagon an Quso G 32 adsorbiert und abzentrifugiert.

c) Waschlösung (= $Ü_3$)

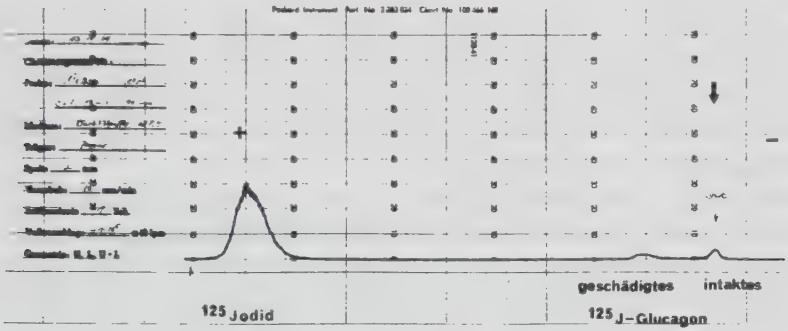
d) Elektrophoretisch reines ^{125}J-Glukagon mit Mercaptoäthanol-Aceton-Essigsäure-Lösung von Quso G 32 abgelöst

Abb. 1

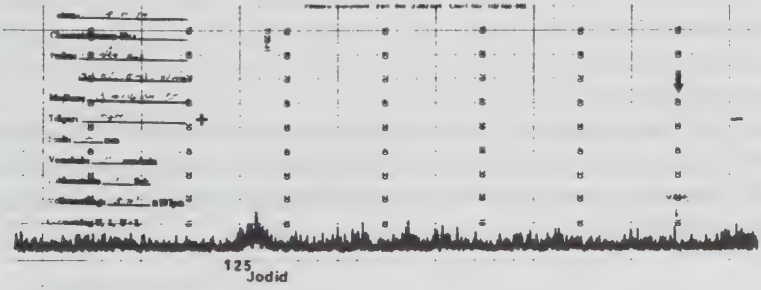
a)


125 Jodid
unreines
125 J - Glucagon

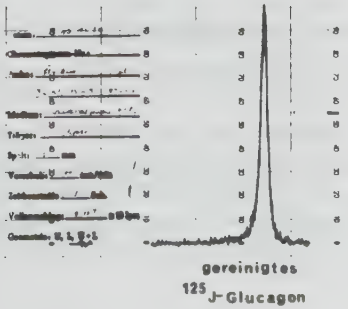
b)


125 Jodid
geschädigtes
intaktes
125 J - Glucagon

c)


125 Jodid

d)


gereinigtes
125 J - Glucagon

^{125}J-Glukagons an der Gesamtaktivität entnommen. Für ^{125}J-Glukagon wurden die Peaks des ungeschädigten und des geschädigten ^{125}J-Glukagons in ihrer Summe veranschlagt. Die spezifische Aktivität (A) wurde nach Gleichung 1 berechnet.

$$\text{Gl.1} \quad \begin{matrix}\text{spez.Aktivität d. } ^{125}\text{J-Glukagons}\end{matrix} = \frac{^{125}\text{J-Gesamtaktivität (mCi)}}{\text{eingesetztes Glukagon (ng)}} \times \begin{matrix}\text{Anteil d. } ^{125}\text{J-Glukagon a.d. ges.Aktivität}\end{matrix}$$

Die Errechnung der spezifischen Aktivität nach Gleichung 1 setzt voraus, ^{125}J-Glukagon habe sich bei der Reinigung wie kaltes Glukagon verhalten. Für die Reinigung des ^{125}J-Glukagon mit QAE Sephadex A 25 haben dies Jørgensen u. Larsen 1972 in Frage gestellt. Sie sind jedoch selbst dieser Berechnung der spezifischen Aktivität gefolgt.
Im Fall der Quso-Reinigung spricht für die Richtigkeit der angenommenen spezifischen Aktivität, daß bei Verwendung von gleicher Glukagonmenge mit verschiedenem Anteil von ^{125}J-Glukagon identische %-Bindungen erreicht wurden (s.u. I.4.1.2.3, Abb.9).

Ein Aliquot von "$Ü_1$" bzw. von einer der Fraktionen aus der Säulenchromatographie wurde mit "Assay-Diluent" verdünnt (Zusammensetzung s. I.3.4.1.1), so daß 0,1 ml ca. 20 pg ^{125}J-Glukagon enthielten.
Wieviel cpm dies bei der Szintillationszählermessung entsprechen, wurde mittels eines 129-J-Prüfstrahlers bekannter Aktivität und der errechneten spezifischen Aktivität des ^{125}J-Glukagons ermittelt.

3.2 Gewinnung von Anti-Glukagon-Serum

3.2.1 Antigenzubereitung

Als Antigen wurden drei unterschiedliche Präparationen gewählt:

1. monomeres Glukagon (Sigma)
2. polymeres Glukagon, hergestellt mittels Carbodiimid-Reaktion in Laktoselösung (Lilly-Glukagon)
3. polymeres Glukagon, hergestellt mittels Carbodiimid-Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung (Sigma-Glukagon)

Zu 2. und 3.:
Bei 2. wurden 20 mg Glukagon in der von der Fa. Lilly erhältlichen Form (10 mg Glukagon + 140 mg Laktose) in 2 ml aqua dest. gelöst. Bei 3. wurden 20 mg Glukagon (Sigma) in 0,5 ml 5 M Guanidin-HCl-Lösung, pH 5,5, gelöst. Für die Kopplungsreaktion ist pH 5,5 optimal (Parker, 1971).
Nach zweimaliger Zugabe von je 20 mg 1-Äthyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid-HCl im Abstand von einer Stunde und einer Gesamtreaktionszeit von mehr als zwei Stunden bei Zimmertemperatur, wurde die Lösung in einen Viskin-Dialyseschlauch überführt und bei $4^{o}C$ für 24 Stunden gegen H_2O dialysiert, um das toxische Carbodiimid zu entfernen (Assan et al., 1965). Nach der Dialyse wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert und das Lyophilisat gewogen.

3.2.2 Applikation des Antigens

Die Versuche wurden mit Kaninchen durchgeführt. Pro Tier wurden 1-2 mg Glukagon oder Glukagonkonjugat appliziert in einer Emulsion aus 1 ml H_2O und 1 ml komplettem Freund'schen Adjuvans. Diese Emulsion wurde durch wiederholte Aspiration durch eine 2er Injektionskanüle hergestellt, bis eine salbenartige Konsistenz erreicht wurde. Die Injektion erfolgte intrakutan auf beiden Flanken, sowie in die Pfoten beider Hinterläufe. Dabei wurden immer wieder dieselben Stellen gewählt, um dieselben Lymphstationen anzusprechen (Parker, 1971).

3.2.3 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung entnahmen wir am 10. Tag nach der letzten Antigenapplikation 5 ml Blut aus der Ohrarterie. Ein Teil des enthaltenen Serums wurde sofort auf Antikörperbildung untersucht.

3.2.4 Kontrolle der Serumeigenschaften

3.2.4.1 Bindungskapazität

Zum Nachweis der Antikörperbildung erstellten wir zunächst immer eine Antikörper-Verdünnungskurve unter den gleichen Bedingungen wie beim Routineansatz (s. unter I.3.4.). Bestimmt wurden die %-gebundenen ^{125}J-Glukagons (%-Bindung) für die verschiedenen Verdünnungen des Antiserums. So konnte die geeignete Verdünnung für die Standardkurve bzw. für die Bestimmung der Glukagonkonzentration ermittelt werden.

3.2.4.2 Affinität bzw. Sensitivität

Nach Berson u. Yalow (1964) können aus der Steilheit der Antikörper-Verdünnungskurve Rückschlüsse auf die Affinität gezogen werden: Je steiler der Abfall, desto größer die Affinität. Wie theoretische Betrachtungen und praktische Erfahrungen jedoch gezeigt haben, ist dieses Kriterium nur ein erster Anhalt für Affinität bzw. Sensitivität (Greenwood, 1969; Berson u. Yalow, 1968).
Mehr Aussagekraft hat der Vergleich von Antikörper-Verdünnungskurven mit unterschiedlichen Mengen an ^{125}J-Glukagon im Ansatz bzw. der Vergleich von Antikörper-Verdünnungskurven mit und ohne Zugabe einer kleinen konstanten Menge an kaltem Glukagon (Hurn u. Landon, 1971).
So wurden jeweils für ein Antiserum 3 Verdünnungskurven angesetzt:

I.	^{125}J-Glukagon	= 20 pg pro Probe
II.	"	= 200 pg pro Probe
III.	"	= 20 pg pro Probe
	kaltes Glukagon	= 180 pg pro Probe

Dies ermöglicht in einem einzigen Experiment: 1. die Bindungskapazität des Antiserums, 2. die Sensitivität des Antiserums und 3. aus dem Vergleich von II. und III. einen eventuellen Verlust an Immunoreaktivität in der markierten Präparation zu prüfen (Kirkham u. Hunter, 1971). Bei Annäherung an die Grenze der Sensitivität verringern sich die Abstände der Verdünnungskurven mit unterschiedlich hoher Glukagonmenge im Ansatz. Bei Verlust

an Immunoreaktivität des ^{125}J-Glukagon ist die Kurve II. flacher und zu geringeren Titern hin verschoben als Kurve III (Hunter, 1971).

Wegen der schnellen und voraussetzungslosen Durchführung dieser Methode ist sie als Screening-Test gut geeignet. Zur exakten Ermittlung der Affinität bzw. Sensitivität ist jedoch die Erstellung einer Standardkurve notwendig. Die Standardkurve entspricht einer Eichkurve, bei der man steigende Mengen an unmarkiertem Glukagon mit einer konstanten Menge an markiertem Glukagon um eine konstante Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren läßt. Bei vorhandener Sensitivität im gewählten Bereich wird mit zunehmender Menge an kaltem Glukagon das im Ansatz vorliegende ^{125}J-Glukagon prozentual weniger vom Antikörper gebunden.

Um maximale Sensitivität zu erreichen, werden in der Literatur folgende Empfehlungen gegeben:

1. Die ^{125}J-Glukagon-Menge im Ansatz ist möglichst kein zu halten. Ein Unterschreiten der Menge, für die im o.g. Screening-Test gerade noch Sensitivität nachgewiesen wurde, bringt jedoch keine Erhöhung der Sensitivität mehr (Chard, 1971).

2. Die Antiserumverdünnung wird am günstigsten so gewählt, daß mit dem vorliegenden ^{125}J-Glukagon eine %-Bindung von 33-50% resultiert. Diese beiden Werte wurden einerseits von Berson u. Yalow (1959b, 1964); Yalow u. Berson (1968, 1970), andererseits von Ekins et al. (1968, 1969, 1970a, b) unter Annahme unterschiedlicher Voraussetzungen als optimal errechnet. Wir arbeiteten meist mit einem Ausgangswert von ca. 50 %-Bindung.

3. Zunächst läßt man nur unmarkiertes Glukagon und Antikörper miteinander reagieren; die Zugabe von ^{125}J-Glukagon erfolgt verzögert, nach Ablauf der Inkubationszeit, die zur maximalen Bindung des ^{125}J-Glukagons nötig ist. Diese Zeit wird in einem Vorversuch ermittelt.

Für die Steigerung der Sensitivität durch diese verzögerte Zugabe von ^{125}J-Glukagon wird von Feldman u. Rodbard (1971) folgende Erklärung gegeben:

Wenn heißes und kaltes Glukagon mit dem Antikörper zu verschiedenen Zeiten zusammengebracht werden, nehmen ihre entsprechenden bound-to-total ratios bei verschiedenen Niveaus ihren Anfang und nähern sich einander bis das Gleichgewicht hergestellt ist. Die Einstellung des Gleichgewichts erfolgt jedoch verzögert, weil die kinetische Konstante der Rückreaktion K_2 kleiner ist als die der Hinreaktion K_1 (Day et al., 1963). Nach Verstreichen einer Gesamt-Inkubationszeit von 2 x der einfachen Inkubationszeit hat deshalb das heiße Glukagon noch nicht so viele Bindungsstellen des Antikörpers besetzt, wie es nach Erreichen des Gleichgewichts könnte. Als Maß für die Sensitivität gilt die Steilheit der Standardkurve (Berson u. Yalow, 1959a u. b). Zur Quantifizierung der Ergebnisse eignet sich die Auftragung der Meßwerte nach Scatchard. Ein linearer Kurvenverlauf im "Scatchard-Plot" spricht für Univalenz und Homogenität von Antikörper und Antigen.
Die Beziehung, die Scatchard 1949 angab und 1959 von Berson u. Yalow zum ersten Mal auf den Radioimmunoassay angewendet wurde, ist vom Massenwirkungsgesetz abgeleitet, welchem offenbar die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen gehorcht (Pressmann u. Grossberg, 1968; Day, 1966).
Sie lautet in der Terminologie des Immunoassays:

$$\frac{\frac{(AgAk)}{Ak}}{(Ag)} = n\,K - \frac{(AgAk)}{\Sigma\,Ak} \cdot K$$

Wenn n = Valenz des Antikörpers
K = Gleichgewichtskonstante
(Ag) = Konzentration des freien Antigens
(Ak) = Konzentration des freien Antikörpers
$\Sigma\,Ak$ = Konzentration des gesamten Antikörpers im System
$(AgAk)$ = Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes

Da $\Sigma\,Ak$ für die jeweilige Studie konstant ist, wird durch Auftragen von $(AgAk)/(Ag)$ gegen $(AgAk)$ (bzw. von B/F gegen B) eine Gerade bestimmt, deren Steigung = - K.
Daß K als Ausdruck der Affinität des Antikörpers auch tatsäch-

lich ein Ausdruck der Sensitivität ist, verdeutlicht auch folgende Überlegung (Parker, 1971):
Bei 50 % Bindung (Ag/Ak) = (Ag) folgt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$K = \frac{1}{(Ak)}$$

Wenn K klein ist, wird die Menge an Antikörpern groß, die nötig ist zur Bindung von substantiellen Antigenmengen; und wenn nun Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen zugrundeliegt, wird eine große Menge an freiem Antikörper den Effekt von unmarkiertem Antigen stark reduzieren.

Da das Scatchard plot in unserem Fall tatsächlich eine lineare Beziehung ergab, verzichteten wir auf weitere Möglichkeiten der Berechnung der Sensitivität, wie über die Michaelis-Menten-Konstante (Odell et al., 1969), über "midrange" (Rodbard et al., 1969), über "lambda" (Gaddum, 1933) oder über "least detectable dose" (Feldman u. Rodbard, 1971).

3.2.4.3 "Spezifität"

Um zu testen, inwieweit das jeweilige Antiserum nur mit pankreatischem Glukagon reagiert oder auch mit Glukagon-ähnlichen Hormonen (s. Tab.3), wurden steigende Konzentrationen an Glukagon bzw. Glukagon-ähnlichen Hormonen mit dem Tracer ^{125}J-Glukagon in Konkurrenz gesetzt. Der Grad der Verdrängung des Tracers von der Ak-Bindung gibt eine Aussage über Maß der Kreuzreaktion eines Hormons mit dem Ak.
Die Spezifität kann quantifiziert werden durch den "Inhibiting-Dose"-Quotienten $\frac{ID1x}{ID2x}$. Hierbei wird die Konzentration des pankreatischen Glukagons und der anderen Hormone verglichen, die eine Verdrängung des Tracers aus der Ak-Bindung um jeweils x-Prozent bewirkt, also eine Reduzierung um x % B/T. Andere Autoren gaben auch die Konzentration an, die eine Reduzierung des bound to free B/F-Verhältnisses um 50 % bewirkt. Hierbei ist die Konzentration des eigentlichen Antigens im Nenner, die des kreuzreagierenden Antigens im Zähler einzusetzen. Bei gleichem Verhalten von Glukagon und anderem Hormon wäre somit der Quotient $\frac{ID1x}{ID2x} = 1$, bei hoher Spezifität für $\frac{ID1x}{ID2x}$ ein hoher Wert zu erwarten.

3.3 Präparation von Plasmaproben zur radioimmunologischen Bestimmung

3.3.1 Plasmagewinnung

Das zu untersuchende Blut wurde in Reagenzröhrchen gesammelt, die so präpariert waren, daß pro ml Blut 500 KIE Trasylol und 1,2 mg EDTA in trockener Form vorlagen.
Wie Eisentraut et al. 1968 zeigten, wird Glukagon durch proteolytische Enzyme im Plasma abgebaut zu Fragmenten, deren Bindungsfähigkeit je nach Antikörper variiert (Heding, 1971). Durch den Proteinasenhemmer Trasylol (Aprotinin) wird dieser Abbau gehemmt (Eisentraut et al., 1968), wobei 500 KIE pro ml Blut während der Sammlung und Präparation der Plasmaproben ausreichend Schutz bieten (Heding, 1971). Die Proben wurden bei $4^{o}C$ zentrifugiert und das erhaltene Plasma bei $-20^{o}C$ eingefroren.

3.3.2 Plasmaextraktion

Wenn alle Proben einer Studie gesammelt waren, wurde das Plasma aufgetaut, zentrifugiert und nach der Methode von Heding (1971) mit Aethanol extrahiert:
Zu 1 ml Plasma wurden 1,8 ml 96%iges Äthanol gegeben, dann wurde zentrifugiert (2000 g, 21^{o}, 14 min) und der Überstand jeweils in ein Reagenzröhrchen dekantiert. Diese Extrakte wurden in einem Exsikkator unter Unterdruck zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 0,5 ml "Assay-Diluent" gelöst.
Zur Kontrolle führten wir Plasmaproben mit, denen vor der Extraktionsprozedur ^{125}J-Glukagon zugeführt worden war. So konnte die Wiederfindung -"recovery" an ^{125}J-Glukagon ermittelt werden. Sie betrug ca.80 % der Ausgangsaktivität. Dies entspricht den Ergebnissen von Heding, 1971.
Die Glukagon-Konzentration der nun vorliegenden Lösung war danach also 1,6 mal höher als im zugehörigen Plasma.

3.4 Radioimmunoassay-Prozedur

3.4.1 Inkubationsbedingungen

3.4.1.1 Assay-Diluent

Der Puffer diente zur Verdünnung aller Immunoassay-Reagenzien. Aus den in der Literatur beschriebenen wählten wir den von Heding verwendeten Phosphat-Puffer mit folgender Zusammensetzung aus:

Natriumphosphat	0,04 M, pH 7,4
NaCl	6 g pro l
Humanalbumin	1 g pro l
Trasylol	100.000 KIE pro l
Thimerosal	0,2 g pro l

Das pH-Optimum für die Ag-Ak-Reaktion wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben: von Shima u. Foa (1968) bei pH 7,4 (Phosphat-Puffer), von Nonaka u. Foa (1969) bei pH 8,0 (Veronalpuffer), von Shopman et al. (1967) zwischen pH 8 und 9,5 (Veronal-Acetat-Puffer bzw. Borat-Puffer). Dabei konnte Shopman zeigen, daß mit unterschiedlichen Puffersystemen bei gleichem pH-Wert unterschiedliche %-Bindungen resultieren. So mögen die differierenden Ergebnisse der verschiedenen Autoren zu erklären sein. Für unser Phosphat-Puffer-System scheint ein pH-Wert von 7,4 optimal.
Die Reaktion von Glukagon mit Antikörper hängt auch ab von der Anwesenheit monovalenter Anionen wie Cl^- (Heding, 1971); deswegen Cl^--Zugabe in Form von Kochsalz.
Humanalbumin, reinst, verhindert Adsorptionsphänomene bei den geringen Glukagonkonzentrationen.
Trasylol inhibiert den proteolytischen Abbau von Glukagon während der Inkubationszeit (Eisentraut et al., 1968; Hazzard et al., 1968; Heding, 1971).
Thimerosal hemmt mikrobielles Wachstum.

3.4.1.2 Temperatur

Es ist bekannt (Berson und Yalow, 1959), daß das Gleichgewicht der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ($Ag + Ak \rightleftharpoons AgAk$)

von der Temperatur abhängt. Bei tieferer Temperatur resultiert eine Verschiebung nach rechts, die Gleichgewichtskonstante $K = \frac{(AgAk)}{(Ag) \cdot (Ak)}$ wird größer (Heding, 1971); allerdings stellt sich das Gleichgewicht langsamer ein (Heding, 1971; Lundquist et al., 1976).
Wir führten, wie die Mehrzahl der Autoren, die Inkubationen bei $4^{o}C$ durch.

3.4.1.3 Inkubationszeit

Die Zeit, die nötig ist, um bei den gegebenen Inkubationsbedingungen den Gleichgewichtszustand zu erreichen, variiert je nach Antikörper. Sie muß deshalb für jedes Antiserum neu bestimmt werden.
Die Gesamt-Inkubationszeit für die radioimmunologische Bestimmung von Glukagon wählten wir 2 x so groß, wegen der verzögerten Zugabe von ^{125}J-Glukagon (s.u. Kontrolle der Serumeigenschaften).

3.4.1.4 Typischer Inkubationsansatz

1. 100 µl Antiserumverdünnung
2. 100 µl Assay-Diluent — für Antikörper-Verdünnungskurven, bzw. Trace-Werte bei Standardkurven oder Glukagonbestimmungen
   oder
   Glukagon-Lösung — für Standardkurven
   oder
   Plasma-Extrakt — für Glukagon-Bestimmungen
3. nach Verstreichen der Zeit, die zur Gleichgewichtseinstellung nötig war, Zugabe von 100 µl ^{125}J-Glukagon-Lösung (ca. 20 pg für Standardkurven und Glukagonbestimmungen).

Bei jeder Studie wurden drei Proben mitgeführt, die anstatt 100 µl Antiserum-Verdünnung 100 µl Assay-Diluent, also keinen Antikörper, enthielten. Diese "Leerwerte" dienten zur Kontrolle, inwiefern freies ^{125}J-Glukagon bei der Trennung von freiem Glukagon-Ak-Komplex wie gebundenes Glukagon behandelt wurde.

Bei Standardkurven und Glukagonbestimmungen wurden zusätzlich drei Proben mitgeführt, die anstatt Glukagon-Lösung bzw. Plasma-

extrakt Assay-Diluent enthielten. Diese "Tracewerte" dienten zur Kontrolle der %-Bindung des ^{125}J-Glukagons in Abwesenheit von kaltem Glukagon.

3.4.2 Trennung von Ak-gebundenem und freiem Glukagon

Von der Vielzahl der beschriebenen Methoden (siehe Einleitung) haben sich wegen der einfachen Durchführbarkeit und der hinreichenden Verläßlichkeit zwei Methoden durchgesetzt:
die Holzkohlentrennung und die Äthanolfällung.
Beide Techniken wurden von uns verwendet.

3.4.2.1 Holzkohlentrennung

Diese Methoden haben Herbert et al. 1965 erstmals für die Trennung von Ag und AgAk-Komplex angegeben und Leclercq-Meyer et al. 1970 sowie Luyckx u. Lefebvre 1970 auf den RIA von Glukagon angewendet. Hierbei wird die Holzkohle zunächst mit Dextran beschichtet. Dieses wirkt als Molekularsieb und läßt das niedermolekulare Antigen zur adsorbierenden Holzkohlenoberfläche durchtreten, den höher molekularen AgAk-Komplex jedoch nicht. Je kleiner das Ag-Molekül ist, desto niedriger kann das Molekulargewicht des verwendeten Dextrans sein.

Die von uns verwendete Suspension enthielt:

2,5 % bzw. 1,25 % Holzkohle (Norit A)
0,25 % bzw. 0,125 % Dextran 70
in einem Puffer aus Na-Barbital (1,471 g/l), Na-Acetat (0,971 g/l) und HCl, pH 7,4.

Sie wurde über Nacht bei 4°C mit dem Magnetrührer gemischt, dann zentrifugiert (4°, 1500 U/min, 10 min). Das Sediment aus beschichteter Holzkohle suspendierten wir in dem gleichen Volumen des Na-Barbital-Na-Acetat-HCl-Puffers, der diesmal zusätzlich noch 0,1 % Humanalbumin enthielt. Die Proteinanwesenheit soll unspezifische Effekte bei der Trennung von Ag und AgAk-Komplexen gering halten.
Nach ca. 45 Minuten Rühren pipettierten wir - immer noch bei 4°C - je 2 ml dieser Suspension zu den 0,3 ml des inkubierten Ansatzes und ließen 35-40 min Zeit zur Adsorption bei gelegent-

lichem Mischen mit dem Vortex, bevor wir bei 4°C, 3000 U/min 12 Minuten zentrifugierten. Der Überstand wurde in ein zweites Reagenzröhrchen dekantiert, Sediment und Überstand im Gammazähler gemessen. Die Aktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtaktivität von Überstand und Sediment, ergibt die sogenannte %-Bindung, also das Verhältnis von gebundenem ^{125}J-Glukagon (B) zum gesamten ^{125}J-Glukagon (T) einer Probe in %. Berücksichtigt wurden zusätzlich der Nulleffekt des Geräts sowie der Leerwert unter den gegebenen Versuchsbedingungen, also die Prozent von der Gesamtaktivität, die sich in Abwesenheit vom Ak im Überstand befanden.

3.4.2.2 Alkoholfällung

Diese Methode hat Heding 1966 erstmals für den RIA angegeben und wurde 1970 von Edwards et al., bzw. 1971 von Heding auf den RIA von Glukagon angewendet. Sie beruht auf dem Prinzip der Löslichkeitsfraktionierung. Bei einer kritischen Konzentration des Fällungsmittels sind Gammaglobuline unlöslich, während das freie Peptid in Lösung bleibt. Die kritische Konzentration hängt ab von Temperatur, Proteinkonzentration, pH und Ionenstärke des Mediums (Chard et al., 1971). Nachdem das Milieu der Assay-Proben schon dem von Heding 1971 (s.u. I.3.1.1.1) entsprach, wählten wir auch bei der Alkoholfällung identische Bedingungen.

Zu den noch 4°C kalten 0,3 ml des Inkubationsansatzes pipettierten wir 1,6 ml 96%igen Äthanol von 21°C, mischten mit dem Vortex und zentrifugierten unmittelbar danach den Eiweiß-Niederschlag bei ca. 2000 g für 15 min. Nachdem der Überstand in ein zweites Reagenzröhrchen dekantiert war, wurde die Aktivität von Sediment und Überstand im Gammazähler gemessen. Die Aktivität im Sediment bezogen auf die Gesamtaktivität ergab unter Berücksichtigung von Nulleffekt und Leerwert die %-Bindung.

4. ERGEBNISSE

4.1 Präparation von ^{125}J-Glukagon

4.1.1 Jodierung - Austestung optimaler Bedingungen

Zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen untersuchten wir die Abhängigkeit der Reaktion von 1. Chloramin T-Konzentration, 2. Reaktionszeit, 3. pH-Wert des Milieus, jeweils bei Zimmertemperatur.
Gefragt wurde nach der "Ausbeute" der Reaktion, also nach dem Anteil des eingesetzten Jodids, das an Glukagon gebunden wurde.

Bei der Versuchsanordnung wurden die Volumina der Reagenzien so gewählt, wie unter "Methodik" angegeben. Um jedoch bei der Vielzahl der Proben nicht zu hohe Aktivitäten handhaben zu müssen, verwendeten wir anstatt der ^{125}J-Jodid-Lösung eine entsprechende Lösung kalten Jodids gleicher Konzentration mit ^{125}J-Jodid in Trace-Konzentrationen.

Zur schnellen Bestimmung der Ausbeute der Jodierungsreaktion suchten wir zunächst nach einer geeigneten Methode zur Trennung von Jodid und Jodglukagon.

Vorversuch:

Wir versuchten die Fällung des Peptids Glukagon mit vier verschiedenen Fällungsmitteln.

1. 20 % Trichloressigsäure (TCA)
2. 1,2 % Pikrinsäure
3. 96 % Äthanol
4. Aceton

Die zu untersuchenden 0,05 ml des Reaktionsgemisches wurden simuliert durch eine in Volumen und Puffermilieu entsprechende Lösung mit gereinigtem ^{125}J-Glukagon. Eine weitere Probenserie enthielt zusätzlich jeweils 0,05 mg Humanalbumin und 0,3 mg NaCl.

Zu dem Reaktionsgemisch wurden je 2 ml Fällungsmittel pipettiert. Nach Mischen mit dem Vortex wurde zentrifugiert (21°C, 1200 g/min, 10 min) und der erste Überständ ($Ü_1$) in ein zweites Reagenzröhrchen dekantiert. Dann wurde erneut Fällungsmittel zum Sediment

pipettiert und nach Mischen zentrifugiert und der Überstand ($Ü_2$) dekantiert. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung von Sediment S und Überständen ($Ü_1$ und $Ü_2$) sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab.4: Fällbarkeit von Glukagon durch verschiedene Protein-Fällungsmittel. Versuche mit ^{125}J-Glukagon

Fällungsmittel	Prozent des eingesetzten ^{125}J-Glukagons ohne Albuminzusatz			mit Albuminzusatz		
	S	$Ü_1$	$Ü_2$	S	$Ü_1$	$Ü_2$
20 % TCA	15,7	78,6	5,7	41,1	50,1	8,8
1,2% Pikrinsäure	38,2	56,4	5,4	89,3	6,0	4,7
96 % Äthanol	71,5	24,4	0,1	97,5	2,5	0,0
Aceton	66,4	33,5	0,1	97,7	2,2	0,1

Erwartungsgemäß steigerte der Albuminzusatz bei allen Fällungsmitteln den Anteil des fällbaren Glukagons. Der höchste Anteil an ^{125}J-Glukagon fand sich bei der Acetonfällung im Sediment (S).

In einem weiteren Versuch zur Aceton-Fällbarkeit des Glukagons zeigte sie jedoch eine pH-Abhängigkeit im Bereich von pH 5,5-8,5 mit den höchsten Werten (98,5 %) bei pH 5,5 und den niedrigsten (70 %) bei pH 8,5. Dies wurde bei der Errechnung der Ausbeuten berücksichtigt, in Form eines sogenannten Fällungsfaktors F. Daß das Jodid bei der Acetonfällung des Glukagons nicht mitgefällt wurde, bestätigte eine Versuchsreihe, in der sich statt der ^{125}Jod-Glukagonlösung kaltes Glukagon im Ansatz befand und statt kaltem Jodid ^{125}J-markiertes Jodid. Wir fanden weniger als 2,2 % der Aktivität im Sediment. Eine pH-Abhängigkeit bestand hier nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse benutzten wir die Acetonfällung zur Ermittlung der Ausbeute der Markierungsreaktion.
Zur Errechnung des Anteils von glukagongebundenem ^{125}J an der Gesamtaktivität diente folgende Formel:

$$\text{Ausbeute} = \frac{(S/\Sigma - 0{,}022)\cdot 100}{\Sigma(F - 0{,}022)} \text{ in \%, wobei}$$

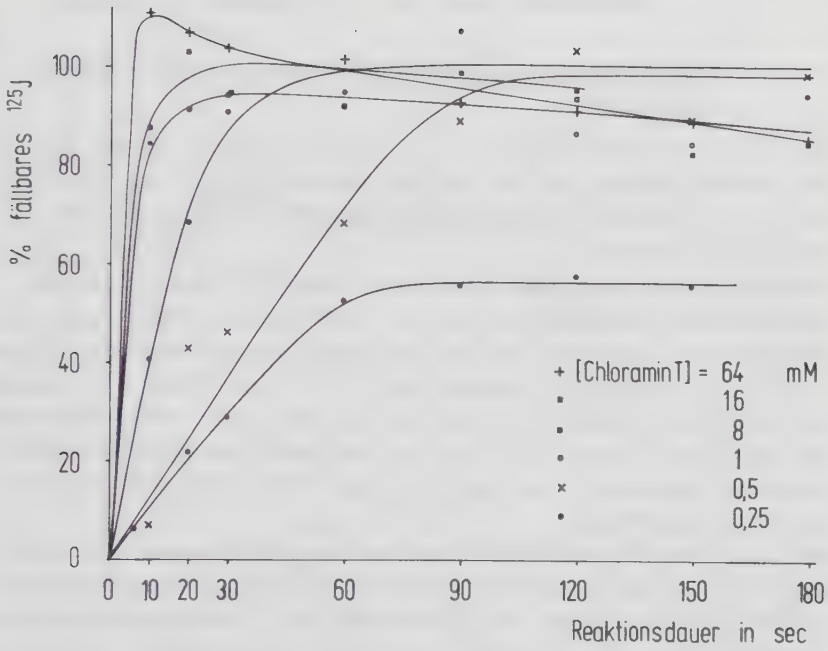


Abb.2 Einbau von ^{125}J in Glukagon in Abhängigkeit von der Chloramin-T-Konzentration und Reaktionsdauer.
Peptidgebundenes ^{125}J mit Aceton gefällt und auf die Fällbarkeit von reinem ^{125}J-Glukagon = 100 % bezogen.

S = Aktivität im Sediment
Σ = Gesamtaktivität
F = Fällungsfaktor
0,022 = ermittelter Anteil des ^{125}J-Jodids im Sediment.

4.1.1.1 Abhängigkeit von Chloramin-T-Konzentration und Reaktionsdauer

Abb.2 zeigt die Abhängigkeit der Glukagon-Jodierung von der Chloramin-T-Konzentration und der Reaktionsdauer bei einem pH von 7,25. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Metabisulfit ($Na_2S_2O_5$) gestoppt.
Erwartungsgemäß sind bei höheren Chloramin-T-Konzentrationen kürzere Reaktionszeiten nötig, um eine maximale Markierung des Glukagons zu erzielen. Bei den höchsten Konzentrationen (16 und 8 mM) erreicht die Markierung nach 5-10 bzw. 30 sec ein Maximum und fällt dann wieder ab. Beträgt die Chloramin-T-Konzentration nur 0,5 bzw. 0,25 mM, so wird die maximale Markierungsrate der höheren Konzentrationen innerhalb der untersuchten Reaktionsdauer nicht erreicht.
Bei der 1 mM Chloramin-T-Konzentration jedoch kombiniert sich eine hohe maximale Ausbeute von 98 % mit einer exakt einzuhaltenden Reaktionszeit von ca. 60 Sekunden und einer anschließenden Plateaubildung. Dies scheint somit die Konzentration zu sein, wo einerseits optimale Aufmarkierung möglich ist, eine deutliche Schädigung des Glukagons jedoch ausbleibt.

4.1.1.2 Abhängigkeit vom pH-Wert

Als Nächstes untersuchten wir die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert bei verschiedenen Chloramin-T-Konzentrationen und Reaktionszeiten. Die Ergebnisse zeigt Abb.3.
Über den sauren bis neutralen Milieubereich waren die Ausbeuten für die jeweiligen Konzentrationen konstant, wobei sich etwa gleiche Werte ergaben für

Chloramin-T-Konz.= 16 mM bei einer Reaktionszeit = 20 bzw.40 sec
Chloramin-T-Konz.= 8 mM bei einer Reaktionszeit = 40 sec
Chloramin-T-Konz.= 1 mM bei einer Reaktionszeit = 60 sec

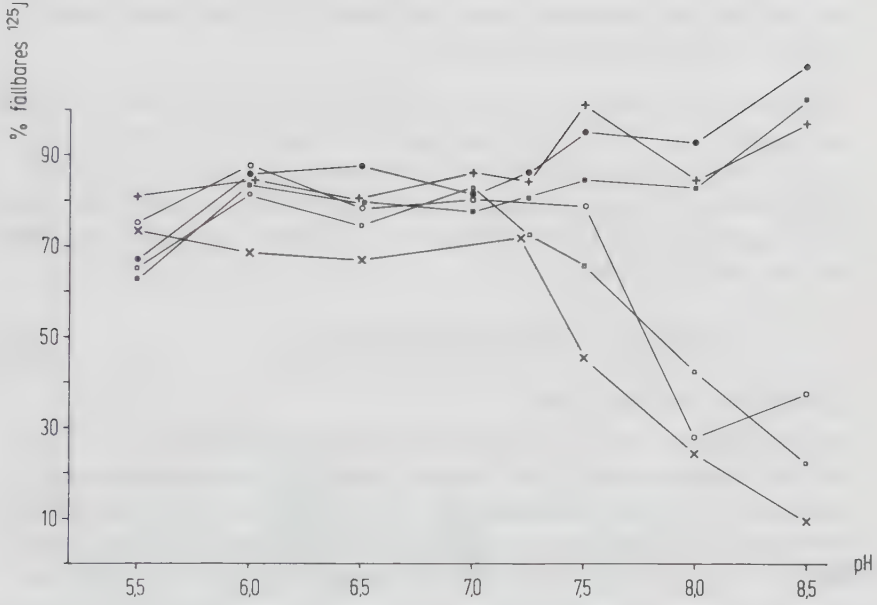


Abb.3 pH-Abhängigkeit des Einbaus von ^{125}J in Glukagon bei verschiedenen Chloramin-T-Konzentrationen und Reaktionszeiten. Versuchsanordnung wie Abb.2.

Chloramin-T-Konzentration	16 mM, Reaktionszeit	40 sec
	16 mM,	20 sec
	8 mM,	40 sec
	1 mM,	60 sec
	1 mM,	40 sec
	1 mM,	20 sec

Im alkalischen Milieu variierten die Ausbeuten je nach Chloramin-T-Konzentration. Bei 16 mM und 8 mM Chloramin-T stieg sie an, bei 1 mM fiel sie dagegen ab.
Die beiden höheren Konzentrationen zeigen bei pH 7,5 ein Maximum der Proteinjodierung. Eine Erklärung für diese Resultate wird in der Diskussion gegeben.

Insgesamt gesehen erwies sich als optimal: eine Chloramin-T-Konzentration von 1 mM, eine Reaktionszeit von 60 sec und ein pH von 7,0. Unter Anwendung dieser Bedingungen erreichten wir mit trägerfreiem ^{125}Jod eine spezifische Aktivität von 300-500 µCi/µg Glukagon, wie sie von anderen Autoren auch bei Glukagon-RIAs benutzt wird (Luyckx, 1972).

4.1.2 Reinigung von markiertem Glukagon

3 Methoden im Vergleich

Aus den bisher beschriebenen Methoden der Reinigung des ^{125}J-Glukagons wählten wir zum Vergleich mit der Quso-Trennung die Molekularsiebchromatographie mit Sephadex G 25 und die Anionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex 25 aus, für die in der Literatur die besten Resultate angegeben werden (s. Einleitung).

Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde das ^{125}J-Glukagon von ein- und derselben Markierung der Reinigung mit Quso bzw. der Vergleichsmethode unterworfen.
Während bei der Quso-Trennung nur eine Fraktion, eben der Überstand "$Ü_4$", reines ^{125}J-Glukagon enthält, stehen bei der Säulenchromatographie mehrere Fraktionen zur Auswahl. Abb.4 und Abb.5 zeigen die Elutionskurven für Sephadex G 25 bzw. QAE Sephadex 25.

4.1.2.1 Charakteristik der Aktivitätsverteilung nach Reinigung

4.1.2.1.1 Sephadex G 25 - Säulenchromatographie

Für Sephadex G 25 stellten sich zwei Peaks dar, der erste bei Fraktion 12 - 14 dürfte dem Glukagon zuzuordnen sein, der zweite dem Jodid. Zwischen beiden Peaks befand sich eine Aktivität, deren Zuordnung zunächst schwerfällt. Da Peak 1 kleiner als

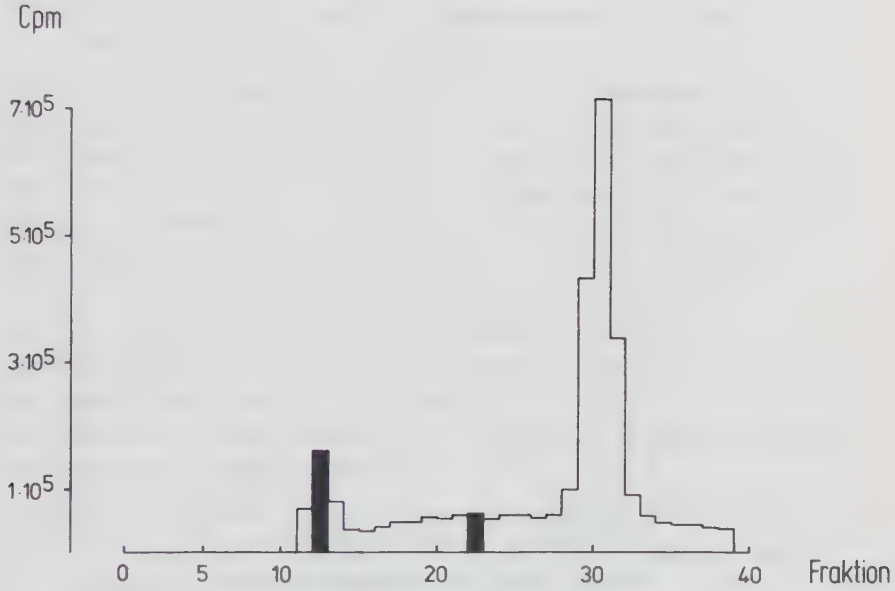


Abb. 4 Säulenchromatographische Reinigung von markiertem Glukagon mit dem Molekularsieb Sephadex G 25, fine;

0,9 x 52 cm, Auftragevolumen 0,1 ml.

Eluant: "Assay Diluent" (s.u. I.3.4.1.1)

Fluß: 9,0 ml/h

Fraktionsvolumen: 1,2 ml

Ordinate: die Radioaktivität von je 5 µl einer Fraktion

Abszisse: Fraktionen

Bei dem Peak um Fr. 30 handelt es sich um ^{125}Jodid; die schwarz gekennzeichneten Fraktionen 13 und 23 wurden immunologisch getestet; Fraktion 23 ergab die besten Resultate.

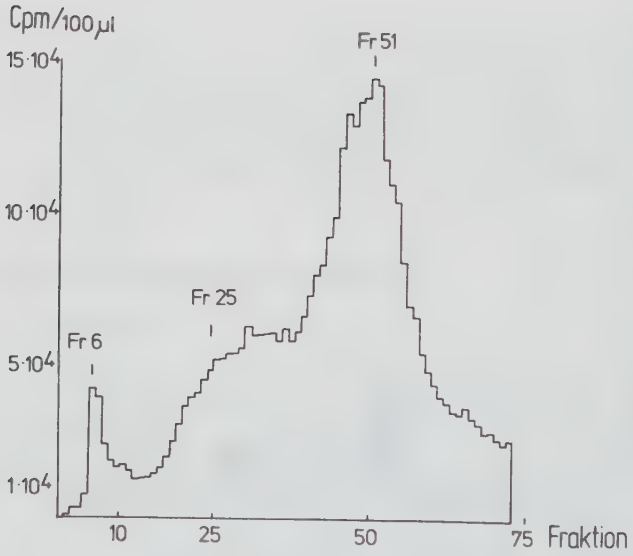


Abb.5 Säulenchromatographische Reinigung von markiertem Glukagon mit dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex A 25, fine;

0,9 x 28 cm, Auftragsvolumen 0,3 ml, Eluant 0,08 M Tris, 0,02 N HCl, 0,08 M NaCl, pH 8,6; Fluß 6,7 ml/h, Fraktionsvolumen 2,7 ml.

Ordinate: Radioaktivität von 0,1 ml je Fraktion;

Abszisse: Fraktionen.

Fr. 6, 25 und 51 wurden immunologisch untersucht; Fr. 51 ergab die besten Resultate.

Peak 2 war, der Anteil an der Gesamtaktivität für Glukagon vor der Reinigung jedoch elektrophoretisch 71 % betrug, muß die Aktivität zwischen den beiden Peaks dem markierten Peptid zugesprochen werden. Ein "tailing effect" aufgrund von Adsorptionsphänomenen war bei den geringen Substanzmengen zu erwarten und durch das anwesende Protein offenbar nicht zu verhindern.

Bei der Untersuchung der Antigenität der Fraktionen 13 und 23 ergab die Ak-Verdünnungskurve mit Fraktion 23 einen erheblich steileren Verlauf und niedrigere Leerwerte von 3,4 % gegenüber 29,5 % für Fraktion 13. Fraktion 31 ergab erwartungsgemäß keine Bindung, es handelte sich um freies ^{125}J-Jodid.
Somit schien Fraktion 23 für den RIA am ehesten geeignet.

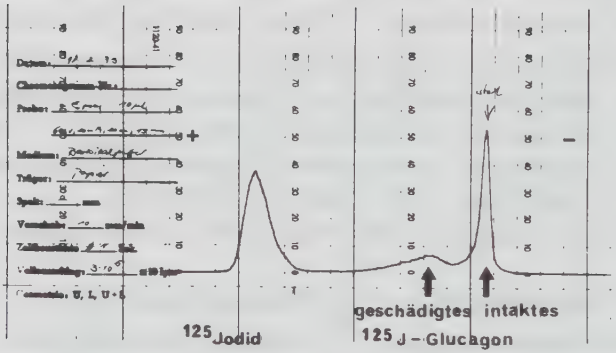
4.1.2.1.2 QAE-Sephadex A 25 - Säulenchromatographie

Für QAE-Sephadex A 25 (Abb.5) fanden wir wie Jørgensen u. Larsen (1972) drei Peaks.
Aus jedem Peak untersuchten wir eine Fraktion auf ihr Verhalten bei der Papierelektrophorese.

1. Fraktion 6: hier trennte sich die Aktivität auf in einen Peak am Start und einen Peak am Ort maximaler Wanderungsgeschwindigkeit (Jodid). Davon entfielen ca. 1/13 der Gesamtaktivität auf den Jodid-Peak.
2. Fraktion 25: hier trennte sich die Aktivität auf in einen Peak am Start und einen Peak in unmittelbarer Nachbarschaft in Richtung Anode, ein Jodid-Peak war nicht vorhanden.
   Von der Gesamtaktivität entfielen ca. 48 % auf den Start-Peak.
3. Fraktion 51: hier trennte sich die Aktivität auf wie in Fraktion 25, nur entfielen auf den Start-Peak mehr als 80 % der Gesamtaktivität.

Um die Frage zu klären, welche der Fraktionen sich für die Verwendung im RIA am besten eignete, wurde für Fraktion 25 und 51 wieder je eine Ak-Verdünnungskurve angesetzt, Fraktion 6 schied wegen des Gehalts an freiem ^{125}J-Jodid von vornherein aus.

6a



6b

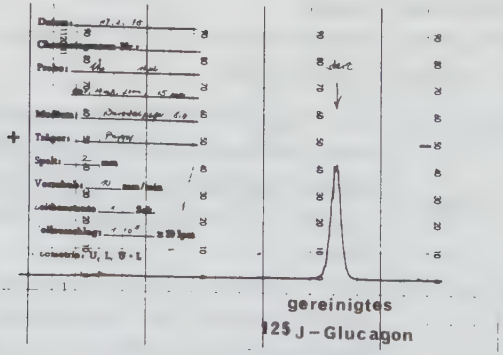
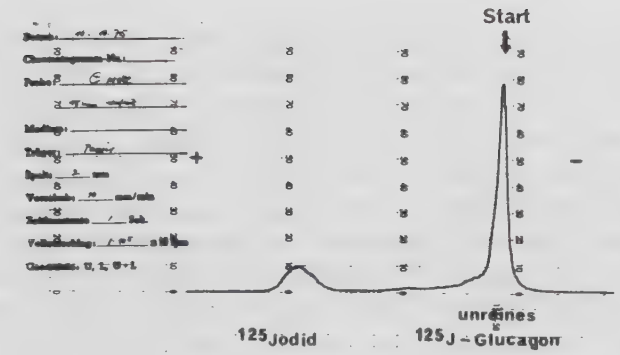


Abb.6 Verteilungsmuster der Radioaktivität auf dem Papierelektrophoresestreifen zur Beurteilung der Effizienz der Quso-Reinigung bei hohem Anteil an ^{125}Jodid und geschädigtem ^{125}J-Glukagon an der Gesamtaktivität vor Reinigung.

a) Vor Reinigung
b) Nach Reinigung mit Quso G 32

7a



7b

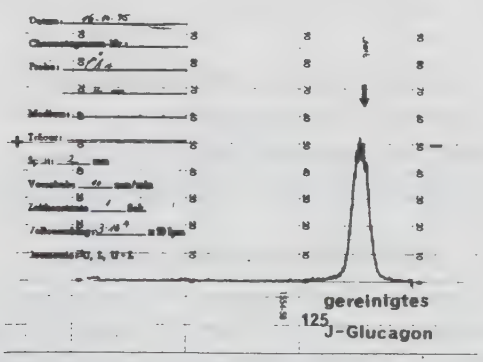


Abb.7 Verteilungsmuster der Radioaktivität auf dem Papierelektrophoresestreifen bei Vorliegen eines ungereinigten ^{125}J-Glukagons üblicher Qualität (nach Optimierung der Markierungsbedingungen wie unter 4.1.1.2 beschrieben).

a) Vor Reinigung
b) Nach Reinigung mit Quso G 32

Die Ak-Verdünnungskurve für Fraktion 51 zeigte einen steileren Verlauf als die der Fraktion 25, die Leerwerte waren mit 5,0 % gegenüber 7,8 % niedriger. Somit schien Fraktion 51 am ehesten geeignet für den RIA.

4.1.2.1.3 Quso G 32 - batch - Verfahren

Bei der Reinigung im Quso 32-batch-Verfahren erhält man 4 Überstände wie unter "Methodik" beschrieben. Abb.1 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Überstände $Ü_1$ - $Ü_4$ für eine Markierung mit niedriger Ausbeute, also hohem ^{125}Jodid-Anteil, Abb.6 für eine Markierung mit hohem Anteil an "damaged" Glukagon. Abb.7 zeigt den Fall optimaler Jodierungsbedingungen. Selbst bei stark verunreinigten ^{125}J-Glukagon-Proben führt die Quso-Reinigung zu einer vollständigen Abtrennung der unerwünschten Komponenten. In $Ü_4$ erscheint nur noch ein Peak, praktisch 100 % der Aktivität liegen am Startpunkt.

4.1.2.2 Gütevergleich der Reinigungsmethoden

Als Qualitätskriterien benutzten wir:

1. das elektrophoretische Verhalten,
2. die Antigenität in Form von Ak-Verdünnungskurven.

4.1.2.2.1 Elektrophoretisches Verhalten

Während bei der QAE-Sephadex A 25-Reinigung auch in der besten, untersuchten Fraktion 51 nur 80 % der Aktivität am Startpunkt verbleiben (= Glukagon-Radioaktivität), liegen im Überstand $Ü_4$ der Quso 32-Reinigung praktisch 100 % der Aktivität am Startpunkt.

4.1.2.2.2 Antigenität

Den Vergleich der Ak-Verdünnungskurven zeigt Abb.8. Daraus geht hervor, daß die Reinigung mit Quso die besten Antigenitätseigenschaften des ^{125}J-Glukagons ergibt.

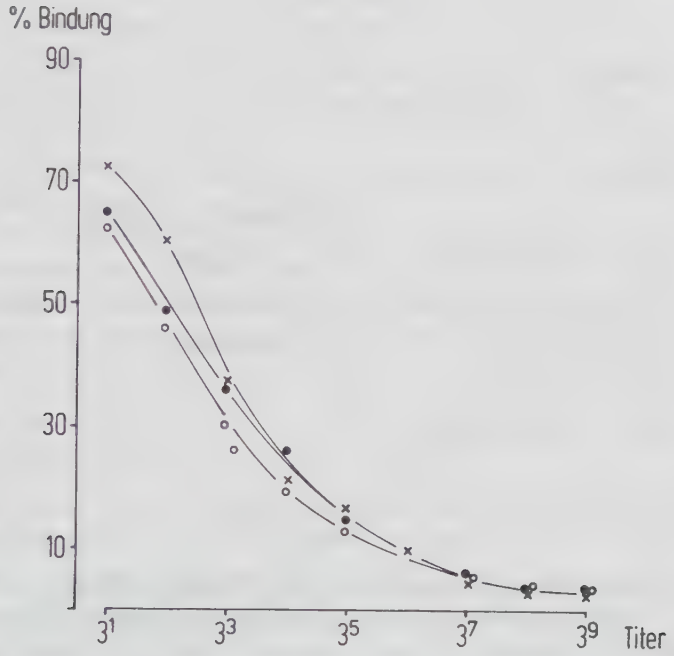


Abb.8 Einfluß des Reinigungsverfahrens von markiertem Glukagon auf die Ak-Bindung

Ak-Verdünnungskurven mit Ak = G3

^{125}J-Glukagon-Menge pro Probe = 20 pg für alle Präparationen

Abszisse: Ak-Titer = 1/Verdünnung des Antiserums im Ansatz

Ordinate: Anteil der Ak-gebundenen Radioaktivität (Holzkohlentrennung, s.a. 3.4.2.1)

Reinigung durch Quso G 32 ×——×
Sephadex G 25 ●——●
QAE Sephadex A 25 ○——○

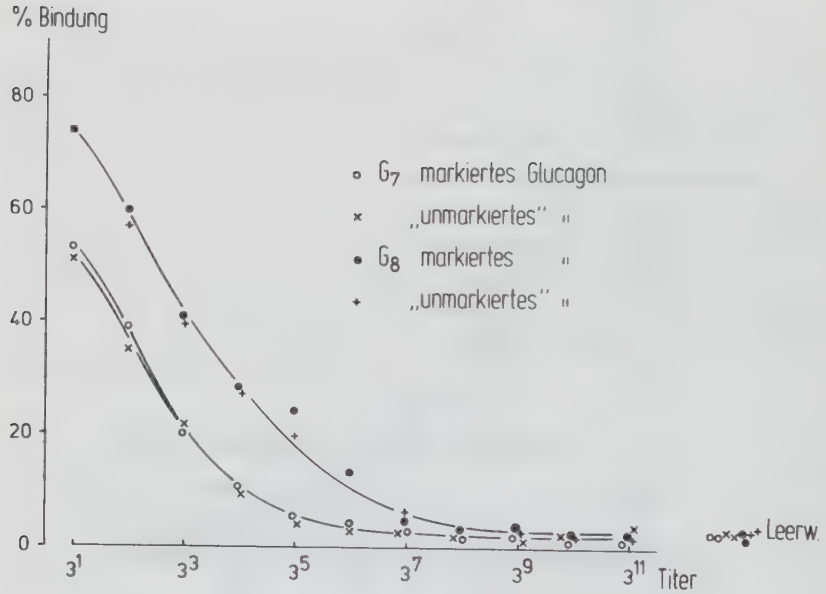


Abb.9 Ak-Verdünnungskurven mit den Antiseren G_7 und G_8 (s.a. Abb.12) jeweils mit

1. markiertem Glukagon = 100 % markiertem Glukagon (200 pg)
2. "unmarkiertem" Glukagon = 10 % markiertem Glukagon und 90 % unmarkiertem Glukagon (= 200 pg)

Das ^{125}J-Glukagon wurde unter optimalen Markierungsbedingungen (s.u. 4.1.1.2) hergestellt und mittels Quso G 32 gereinigt. Das Ergebnis zeigt, daß sich markiertes und "unmarkiertes" Glukagon immunologisch gleich verhalten.

4.1.2.3 Charakterisierung der Güte des markierten und Quso-gereinigten ^{125}J-Glukagons

Als Indikatoren einer molekularen Integrität werden in der Literatur folgende Eigenschaften angegeben:

1. Fällbarkeit von ca. 95 % der Aktivität (Luyckx, 1972);
2. Adsorption an dextranbeschichtete Holzkohle von 86-99 % (Luyckx, 1972);
3. in der Papierelektrophorese minimaler Anteil an wandernder Aktivität (Shima u. Foa, 1968);
4. Ak-Bindung von 85 % der Aktivität in Anwesenheit von Antikörperüberschuß (Luyckx, 1972);
5. Ak-Verdünnungskurven-Verhalten bei verschieden hohen ^{125}J-Glukagon-Anteilen am Gesamtglukagon im Ansatz (Kirkham u. Hunter, 1971).

Zu 1. Bei Fällung fanden wir 98 - 99 % der Radioaktivität im Sediment (Tab.4).

Zu 2. Die von uns verwendete Holzkohlen-Dextran-Suspension adsorbierte 98 - 99 % der Radioaktivität.

Zu 3. Wie in Abb.1, 6 und 7 gezeigt, ist bei der Elektrophorese der ^{125}J-Glukagon-Präparation kein wandernder Anteil mehr zu entdecken. Damit erreichten wir einen erheblich höheren Reinheitsgrad als Shima und Foa (1968) mit der Zellulose-Säule, deren Radiopapierelektrophoresen nooh alle einen deutlich sichtbaren Peak an wandernder Aktivität, entsprechend einem verbleibenden Anteil an geschädigtem ^{125}J-Glukagon zeigten.

Zu 4. Wir erreichten Antikörperbindungsquoten bis zu 99 % und immer weit mehr als 85 % (s. Abb.15 und 22).

Zu 5. Wie unter Methodik besprochen, zeigen Ak-Verdünnungskurven mit verschieden hohem Anteil an markiertem Glukagon am Gesamtglukagon gleiche Kurvenverläufe, wenn die Immunoreaktivität des markierten mit der des kalten Glukagons übereinstimmt. In Abb.9 ist zu sehen, daß dies zutrifft für Kurven mit 1/10 bis 10/10 Anteil markierten Glukagons am gesamten Glukagon.

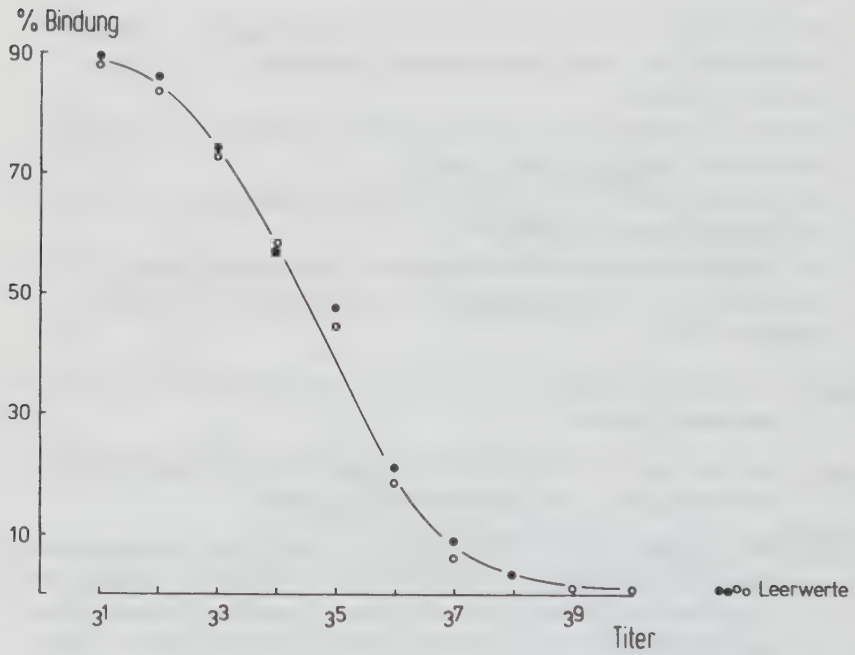


Abb.10 Ak-Verdünnungskurven zweier ^{125}J-Glukagon-Präparationen im Vergleich

^{125}J-Glukagon von L.Heding (QAE Sephadex A 25-Reinigung) ●——●

^{125}J-Glukagon unseres Labors (Quso G 32) o——o

Ak = G_4; Holzkohlentrennung (2,5 %)

Wir verglichen außerdem Glukagon, welches wir markiert und mit Quso 32 gereinigt haben, mit ^{125}J-Glukagon, welches von L. Heding, Novo-Research Institute, geliefert wurde. Aus Abb.10 folgt, daß das von uns markierte Glukagon eine ähnlich große Immunoreaktivität besitzt wie das Präparat von Heding.

Das nach der beschriebenen Methodik präparierte ^{125}J-Glukagon entspricht somit in allen Punkten den gestellten Forderungen und hält dem Vergleich mit hochwertigen Präparationen anderer Autoren stand.

4.2 Gewinnung von Anti-Glukagon-Sera

4.2.1 Antigenzubereitung

Wie unter Methodik erwähnt, verwendeten wir drei verschiedene Ag-Zubereitungen:

1. Glukagon,
2. Glukagon-Polymer I, hergestellt mittels Carbodiimid-Reaktion in Laktose-Lösung,
3. Glukagon-Polymer II, hergestellt mittels Carbodiimid-Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung.

Von den beiden Polymer-Präparationen untersuchten wir die Molekulargewichtsverteilung der unter 3. genannten mittels der Biogel-P-60-Säulenchromatographie (Säule 1 cm Ø, 28 cm lang, Lösungsmittel 1 M Guanidin-HCl).
Zunächst wurde ein Kalibrierungslauf durchgeführt. Als Eichproteine dienten hierbei Glukagon (MG 3485), Cytochrom C (MG 12000) und Hühnereiweiß (MG 45000) gelöst in 50 µl Guanidin-HCl-Lösung.

Nachdem wir das Polymer dialysiert und lyophilisiert hatten, unterwarfen wir hiervon ebenfalls 50 µl unter gleichen Bedingungen wie für die Eichproteine der Säulenchromatographie.
Abb.11 zeigt die Extinktion im Verlauf der Säulenchromatographie für die Eichproteine und für das dialysierte Polymer.

Die Eichproteine wurden gut aufgetrennt und erschienen erwartungsgemäß in etwa gleichem Abstand entsprechend ihrem MG im Eluat. Hühnereiweiß etwa Fr. 8; Cytochrom C etwa Fr. 16; Gluka-

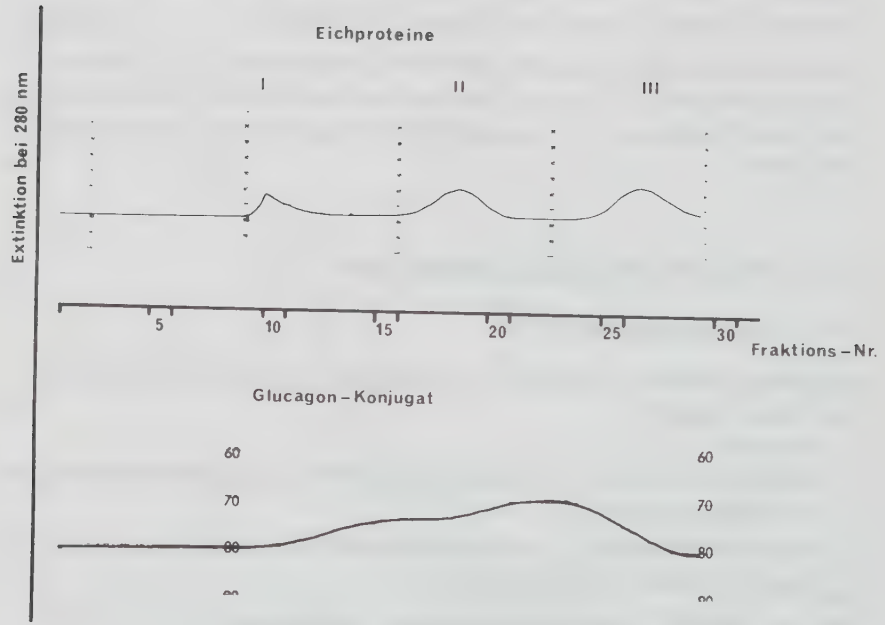


Abb.11 Abschätzung des Molekulargewichts der Glukagon-Konjugate II durch Molekularsiebchromatographie (Säulenchromatogramm von Glukagon-Konjugat II, hergestellt mittels Carbodiimid-Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung)

Chromatogramm von Proteinen definierten Molekulargewichts

I	Hühneralbumin	(MG 45000)
II	Cytochrom C	(MG 12000)
III	Glukagon	(MG 3485)

Chromatogramm des Glukagon-Konjugats II

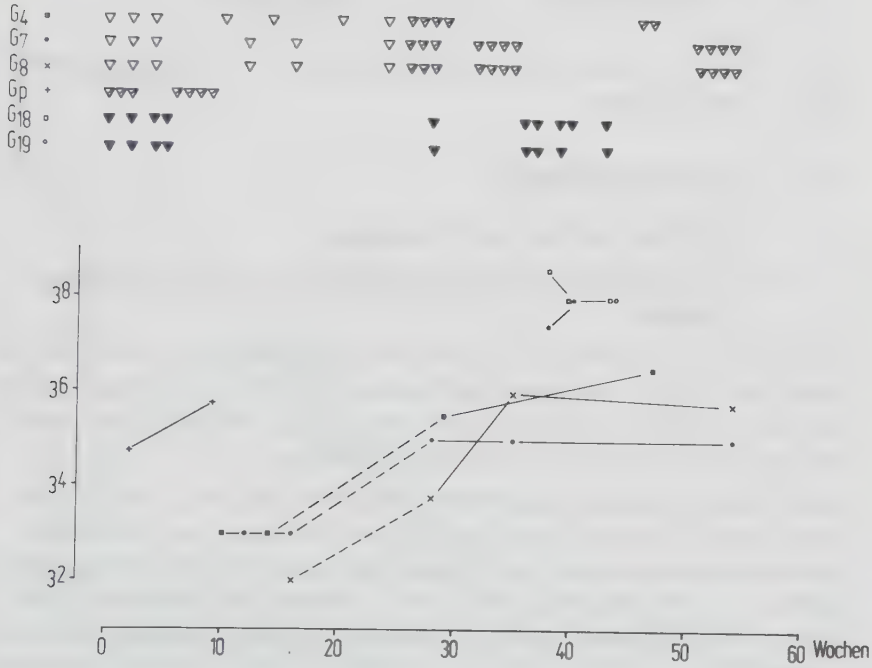


Abb.12 Antikörper-Titer in Abhängigkeit von der Art des Immunogens und der Immunisierungsdauer

Ordinate: Ak-Titer bei dem 50 % Bindung (B/T % = 50) erreicht wird
Abszisse: Wochen nach Immunisierungsbeginn

Immunogene:

▽ unkonjugiertes Glukagon

▽ konjugiertes Glukagon, Reaktion in Laktose-Lösung

▼ konjugiertes Glukagon, Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung

Ak: G_4 ■, G_7 ●, G_8 ×, G_p +, G_{18} □, G_{19} ○

gon etwa Fr. 25. Das dialysierte Konjugat ergab eine doppelgipfelige Kurve, die sich von Fraktion 5 bis 27 hinzieht. Dies entspricht einem Molekulargewicht von Glukagon aufwärts bis ca. 65.000. Die beiden Gipfel liegen bei einem MG von ca. 10.000 bzw. 40.000.
Die Mehrzahl der Konjugate hatte somit das dreifache bis zwölffache MG von Glukagon.

4.2.2 Serumeigenschaften

4.2.2.1 Einfluß der Art des Immunogens

4.2.2.1.1 Titerverhalten in Abhängigkeit von der Art des Immunogens

Als Kriterium für den Erfolg der Immunisierung benutzten wir den Titer des Serums, bei dem eine Bindung von 50 % des Glukagons im verwendeten Assay-System resultierte. Abb.12 zeigt Injektionen und Titerverläufe im zeitlichen Zusammenhang.

Nach Immunisierung mit monomerem Glukagon stellten sich in 10 Wochen nach 3 Injektionen Titer von 45 ein, die nach weiteren Boosterinjektionen nicht anstiegen und deshalb nicht fortgeführt wurden. Als die Immunisierung nach 21 Wochen mit polymerem Glukagon I (in Lactose-Lösung) fortgesetzt wurde, erhöhten sich die Titer schnell um einen Faktor von jeweils ca. 9 auf etwa 410 und waren durch weitere Injektionen im Verlaufe eines Jahres nur wenig zu steigern.
Ein vorher nicht immunisiertes Kaninchen entwickelte nach nur 3 Injektionen von polymerem Glukagon in wöchentlichem Abstand ebenso hohe Titer wie die anderen Tiere.
Die Verwendung von Polymer II (Polymerisierung in Guanidin-HCl-Lösung) brachte nach 7 Injektionen innerhalb eines halben Jahres Titer von ca. 12.000.

4.2.2.1.2 Sensitivität in Abhängigkeit von der Art des Immunogens

Für die Sera, die wir mit dem Polymer I erhielten, ermittelten wir eine kleinste bestimmbare Glukagonmenge von ca. 100 pg/100 µl für die Sera G 18 und G 19 10 pg/100 µl.

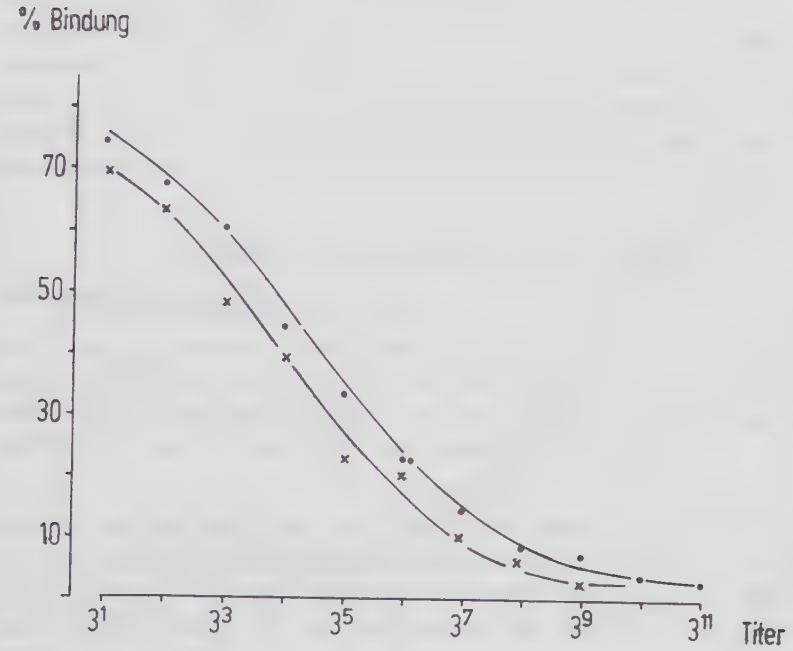


Abb.13 Ak-Verdünnungskurve bei Serumgewinnung nach 10 bzw. 21 Tagen

Ordinate: % im Überstand bei Holzkohlentrennung (2,5 %)
Abszisse: End-Titer
Ak = Gp (s.a. Abb.12)

Blutentnahme 10 Tage nach Auffrischimpfung ●——●
Blutentnahme 21 Tage nach Auffrischimpfung ×——×
^{125}J-Glukagon 20 pg/Probe

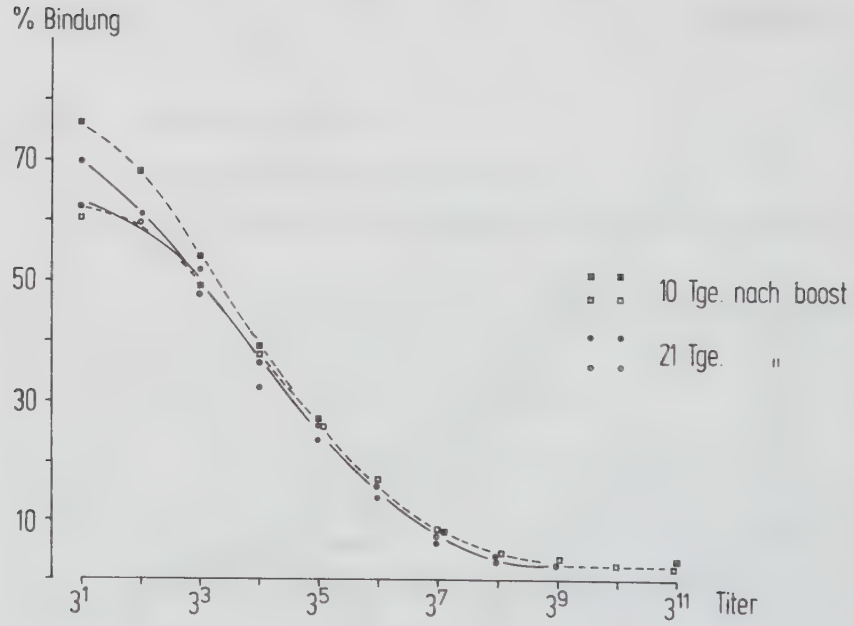


Abb.14 Ak-Verdünnungskurve bei Serumgewinnung nach 10 bzw. 21 Tagen nach letzter Boosterung

Ordinate: % im Überstand bei Holzkohlentrennung (2,5 %)
Abszisse: End-Titer
Ak = G_7 (s.a. Abb.12)

Dunkle Zeichen (■ , ●) 20 pg ^{125}J-Glukagon

Helle Zeichen (□ , ○) 200 pg ^{125}J-Glukagon

4.2.2.2 Serumeigenschaften in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme

Abb.13 zeigt den Vergleich der Seren bei Entnahme 10 Tage und 21 Tage nach Auffrischimpfung. Bei Entnahme am 10. Tag nach Boosterung wurden höhere Titer erreicht als mit Seren vom 21. Tag der Blutentnahme (Abb.13).
Außerdem lag die Sensitivität bei früherer Entnahme höher; ein Vergleich der Ak-Verdünnungskurven bei verschieden hohen Konzentrationen an markiertem Glukagon ergab für Seren vom 10. Tag gegenüber Seren vom 21. Tag stärkere Differenzen (Abb.14).

4.2.3 Die Eigenschaften des Serums G 18 bzw. G 19

4.2.3.1 Ak-Verdünnungskurve (Abb.15)

Abb.15 zeigt die hohe Bindungskapazität der Sera mit einer maximalen Bindung von 99 % bei Ak-Überschuß und die hohen Titer, bei denen die 50%ige Bindung erreicht wird. Die typischen sigmoidalen Kurven von G 18 und G 19 verlaufen etwa parallel.

Wir erstellten zum Vergleich eine Ak-Verdünnungskurve mit 3 Punkten für den Ak K 964, den wir von L. Heding erhielten. Die Verbindung der 3 Punkte ergab eine Linie, die ebenfalls parallel zur Ak-Verdünnungskurve von G 19 bzw. G 18 lag. Zur 50 % Bindung waren jedoch höhere Ak-Konzentrationen als für G 18 und insbesondere G 19 nötig.

4.2.3.2 Einfluß der Inkubationszeit

Um die optimale Inkubationszeit für den RIA herauszufinden, haben wir die %-Bindung der Sera G 18 und G 19 in Abhängigkeit von Inkubationszeit bestimmt für Titer, wie sie im RIA benutzt werden sollten (Abb.16).
G 19 war in 6 h schon auf Werte im plateaunahen Bereich angestiegen und erreichte nach 12 h das nur noch langsam steigende Plateau.
G 18 zeigte einen etwas langsameren Anstieg; es erreichte innerhalb von 24 h ein etwas steiler ansteigendes Plateau.
Die Erstellung von Ak-Verdünnungskurven mit verschiedenen Inku-

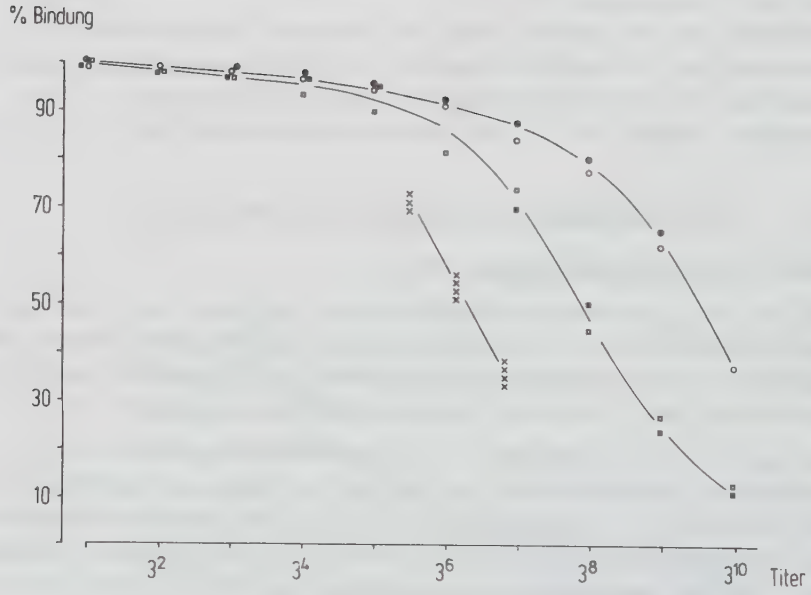


Abb.15 Verdünnungskurven von Ak G 18, G 19 und K 964

Ordinate: % Bindung (B/T %) bei Äthanolfällung
Abszisse: End-Titer

G 19	○——○	24 h Inkubationszeit
	●——●	48 h Inkubationszeit
G 18	□——□	24 h Inkubationszeit
	■——■	48 h Inkubationszeit
K 964	×——×	

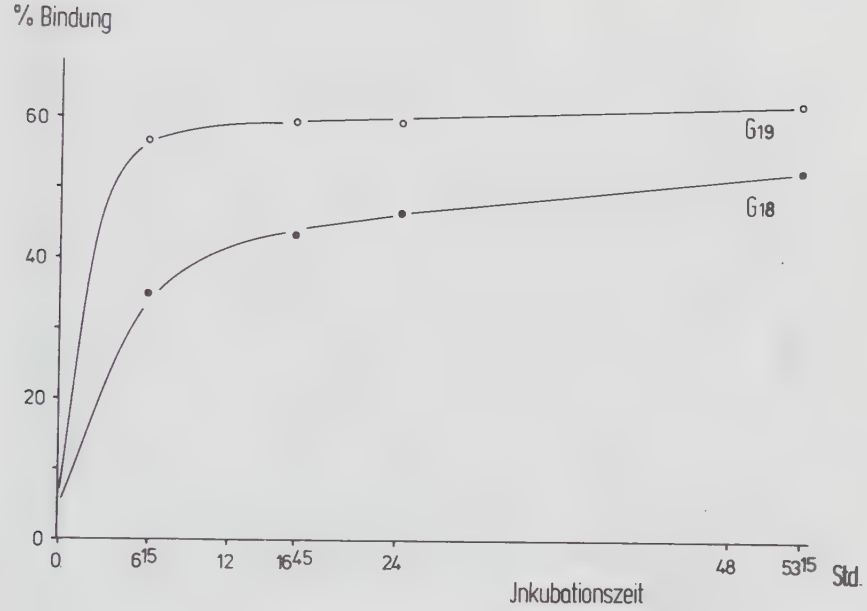


Abb.16 Einfluß der Inkubationsdauer auf die %-Bindung
Ordinate: % Bindung (B/T %) bei Alkoholfällung
Abszisse: Inkubationszeit in Std.

Ak = G_{18} ●——●
Ak = G_{19} ○——○

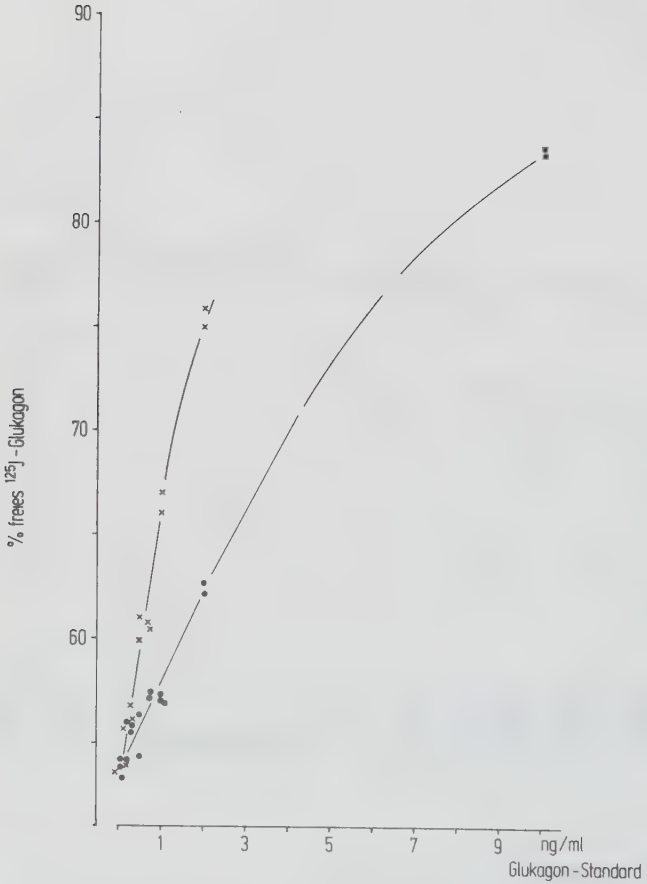


Abb.17 Standardkurven von Ak K 964 und G 19
Ordinate: % freies ^{125}J-Glukagon (% F/T)
Abszisse: Konzentration an kaltem Glukagon

Ak = K 964 ×——×

Ak = G 19 ●——●

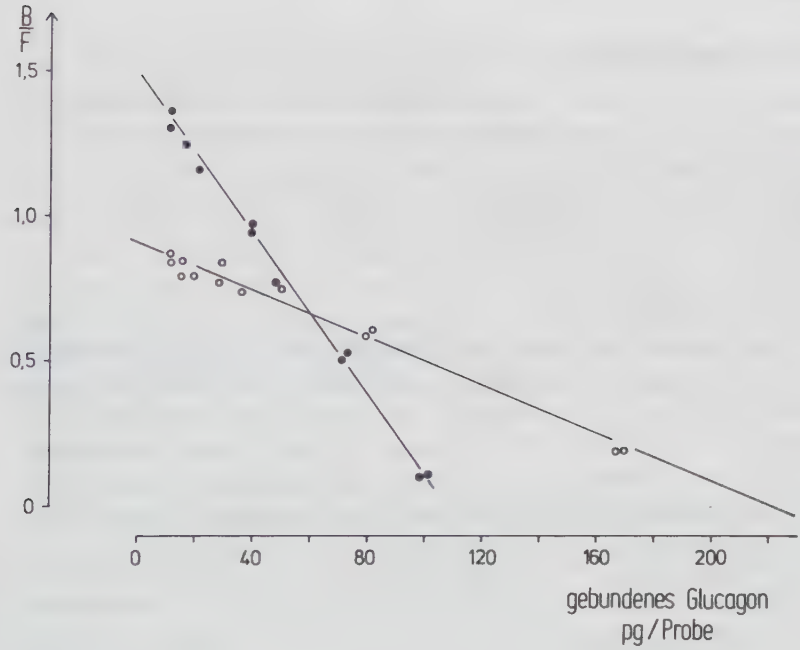


Abb.18 Scatchard plot von Ak K 964 und G 19

Ordinate: Verhältnis von gebundenem zu freiem ^{125}J-Glukagon (B/F)

Abszisse: (gebundenes Glukagon) = (^{125}J-Glukagon + Glukagon) · B/T

Ak = K 964 ●——●

Ak = G 19 o——o

bationszeiten ergaben sowohl bei G 18 als auch bei G 19 einen identischen Verlauf für eine Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h. Wir führten deshalb alle Bestimmungen mit einer Inkubationszeit von 24 h durch bzw. 2 x 24 bei Standards und Plasmabestimmungen.

4.2.3.3 Standardkurve

Lediglich G 18 und G 19 erreichten eine für die Bestimmung von Plasma-Glukagon ausreichende Sensitivität. Abb.17 zeigt die Standardkurven von G 19 und K 964 im Vergleich. Beide Kurven weisen Linearität im erforderlichen Bereich unter 2 ng/1 ml auf; die von G 19 verläuft etwas weniger steil.

4.2.3.4 Scatchard plot

Bei Übertragung der Werte der Standardkurven in die Schreibweise des Scatchard plots (Abb.18) zeigt sich die etwas geringere Sensitivität von G 19 ebenfalls. Der Graph verläuft für G 19 flacher als für K 964. Da für beide Ak eine lineare Beziehung resultierte, konnten die Gleichgewichtskonstanten aus der Steigung der Geraden ermittelt werden (s.u. Methodik I.3.2.4.2). Für K 964 ergab sich eine Gleichgewichtskonstante von 13.8 (ng^{-1}), für G 19 K = 4.08 (ng^{-1}).

4.2.3.5 "Spezifität"

Die Standardverdünnungen (Abb.19 a, b) der verschiedenen Hormone ergeben im Fall des pankreatischen Glukagons eine Verdrängung des ^{125}J-Glukagons aus der Ak-Bindung mit einer kleinsten meßbaren Menge von ca. 10 pg Glukagon. Glukagon-ähnliche Hormone Gastric inhibitory polypeptide (GIP), vasoactive intestinal peptide (VIP) und Sekretin zeigen selbst bei 100 µg Hormon keine Verdrängung des ^{125}J-Glukagons. Im Falle des Enteroglukagon konnte wegen der geringen verfügbaren Menge nur bis 1,0 µg untersucht werden; eine Verdrängung war nicht nachweisbar. Der $\frac{ID_1x}{ID_2x}$ -Index ist somit für keines der Glukagon-ähnlichen Hormone anzugeben, da im untersuchten Bereich überhaupt keine Verdrängung erfolgte. Er muß also für GIP, VIP und Sekretin weit über

10.000 und für Enteroglukagon über 100 liegen. Anders ausgedrückt: die Kreuzreaktivität liegt für GIP, VIP und Sekretin bei < 0.0001, bei Enteroglukagon bei < 0.01.

4.3 Präparation der Plasmaproben zur radioimmunologischen Bestimmung - Plasmaextraktion

4.3.1 Extraktionsrate und Reproduzierbarkeit

Um die Ausbeute der Extraktion von Plasmaglukagon zu ermitteln, gaben wir vor der Extraktion eine bekannte Menge an ^{125}J-Glukagon zum Plasma und verglichen die Radioaktivität der Proben vor und nach der Extraktion. Nach der Extraktion fanden wir konstant über 80 % (ca. 81 %) der Ausgangsaktivität im Extrakt. Für die Proben eines Extraktionsansatzes schwankte die Extraktionsrate um nur 0,6 %. Dieses Ergebnis entsprach den Angaben von Heding (1971).

4.3.2 Immunologische Integrität des extrahierten Glukagons

Von Interesse war die Klärung der Frage, ob durch den Extraktionsvorgang Glukagon geschädigt wird. Hierzu wurden zu Proben von 1 ml Plasma einerseits je 100 µl ^{125}J-Glukagon-Lösung, andererseits je 100 µl ^{125}J-Glukagon-freier Assay-Puffer zugegeben. Nach der Extraktion wurde das trockene Extrakt in 1 ml Assay-Puffer gelöst. Bei den noch ^{125}J-Glukagon-freien Extrakten enthielt dieser Puffer eine den ^{125}J-Glukagon-haltigen Extrakten entsprechende ^{125}J-Glukagonmenge. So standen Plasmaextrakte zur Verfügung, deren ^{125}J-Glukagon der Extraktion unterworden wurde und andere, deren ^{125}J-Glukagon der Extraktion nicht unterworfen wurde. Bei der Prüfung der immunologischen Eigenschaften dieses ^{125}J-Glukagons im Antikörper-Verdünnungsverhalten zeigte sich kein Unterschied, wir erhielten identische Kurven.

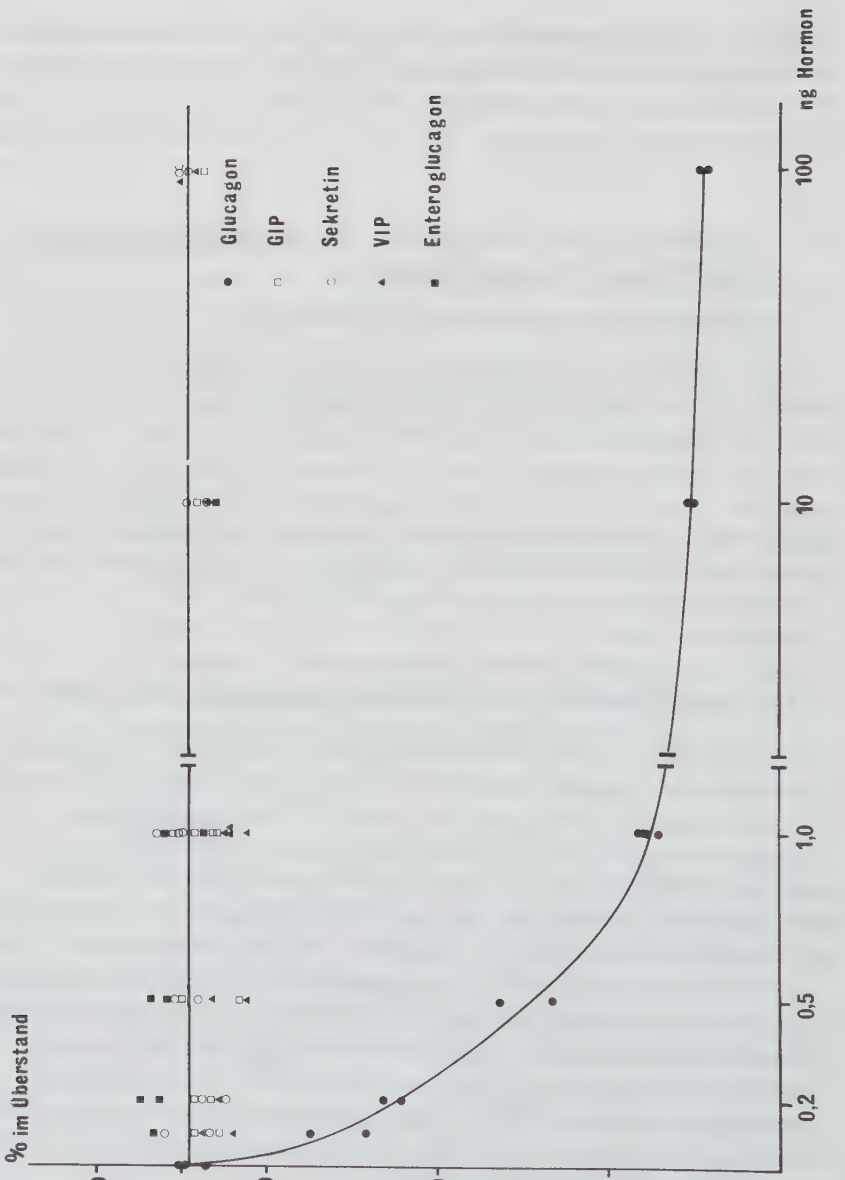

% im Überstand
40
30
20
10
0,2
0,5
1,0
10
100
ng Hormon
Glucagon
GIP
Sekretin
VIP
Enteroglucagon

Abb. 19a

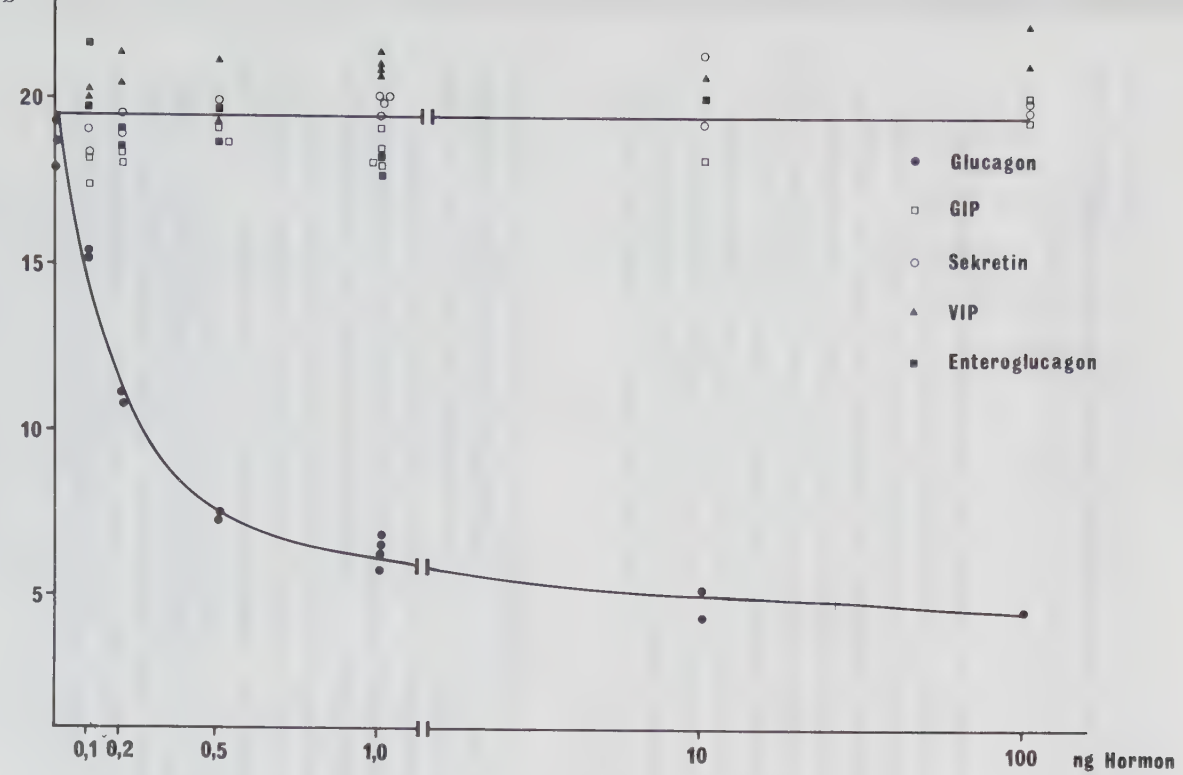


Abb.19a+b Spezifität von Ak G 18 (a) und 19 (b) gegenüber Glukagon-ähnlichen Hormonen
Ordinate: % des ^{125}J-Glukagons im Überstand bei Holzkohlentrennung
Abszisse: Menge an Hormon, welche in der Probe mit dem ^{125}J-Glukagon um die Ak-Bindung konkurrieren kann.

Glukagon ● ; Enteroglukagon I ■ ; GIP □ ; Sekretin ○ ;
VIP ▲ .

4.4 Radioimmunoassay-Prozedur - Bedingungen bei Inkubation und Trennung von gebundenem und freiem Glukagon - Unspezifische Effekte durch Albumin- und Holzkohlenkonzentration

Bei der Trennung von freiem und Ak-gebundenem Glukagon durch Holzkohle verändern Plasmaproteine unspezifisch den Anteil der Radioaktivität im Überstand. Zum Studium dieser unspezifischen Effekte benutzten wir Albumin, das wegen seines hohen quantitativen Anteils an Plasmaprotein und der außergewöhnlichen Bindungseigenschaften mit hoher Versatilität (Glazer, 1970) hierfür geeignet schien. Wie Hunter u. Ganguli 1971 bei anderen Hormonen fanden, verhält es sich bei der Holzkohlentrennung wie Plasma selbst. Wir untersuchten die Abhängigkeit der Holzkohlentrennung von der Albumin- und Holzkohlenkonzentration mit zwei verschiedenen Antiseren G 5 (Abb. 20) und G 18 (Abb. 21).

Abb.20 zeigt den Kurvenverlauf 1. in Anwesenheit von Antiserum G 5 (End-Titer 30), 2. in Abwesenheit von Antiserum (Leerwerte) für eine konstante Holzkohlenkonzentration von 2,5 g% bei einem Suspensionsvolumen von 2 ml (s. Methodik). Bei zunehmenden Humanalbuminkonzentrationen steigt der Anteil der Radioaktivität im Überstand, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ak annähernd parallel und erreicht im Bereich hoher Albumin-Konzentrationen annähernd konstante Werte. Insgesamt resultiert eine Änderung der %-Radioaktivität i.Ü. von maximal 8-9 %. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob Albumin gleich zu Anfang zugegeben und mit inkubiert wurde, oder erst mit der Holzkohlensuspension, also unmittelbar vor dem Trennungsvorgang. Im Gegensatz zu den Resultaten für Humanalbumin, ergab die Verwendung von bovinem Albumin keinen parallelen Kurvenverlauf. Wäh-

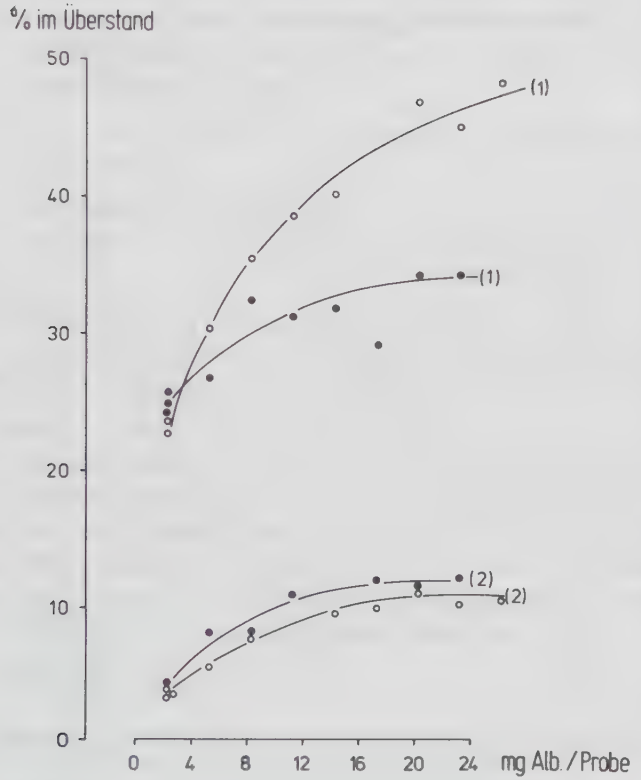


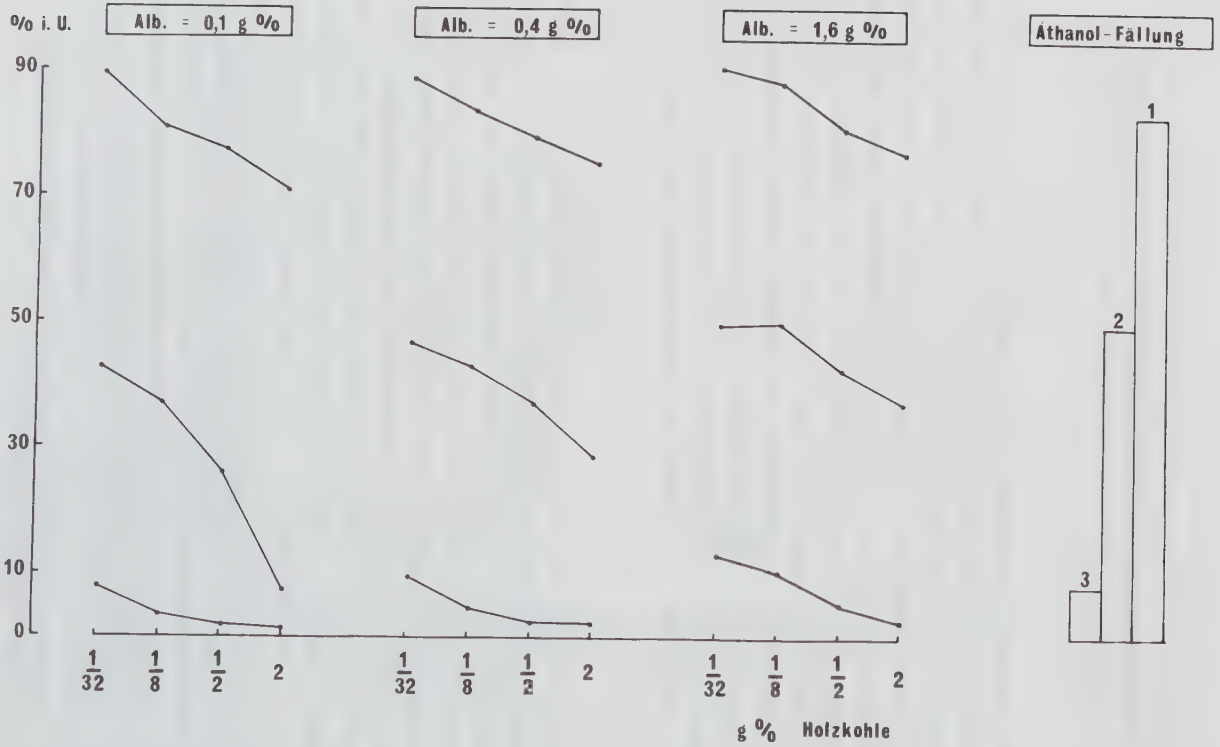
Abb.20 Einfluß der Albuminkonzentration bei der Trennung von Ak-gebundenem und freiem Glukagon mit Holzkohle 2,5 %

Ordinate: % des ^{125}J-Glukagons im Überstand;
Abszisse: Albumin-Menge pro Probe

Bovines Albumin ○——○ mit Ak G 1 (1) Humanes Albumin ●——● ohne Ak-Anwesenheit (2)

Immunogen für Ak G 1 war an bovines Albumin gekoppeltes Glukagon (Dr. Schmid)

Abb. 21


% i. U.
Alb. = 0,1 g %
Alb. = 0,4 g %
Alb. = 1,6 g %
Äthanol-Fällung
90
70
50
30
10
0
1/32
1/8
1/2
2
g % Holzkohle
1
2
3

rend die Leerwerte selbst bei der maximalen Albuminkonzentration nur um 7 % stiegen, war in Anwesenheit von Ak ein Anstieg von 25 % zu registrieren. Hierzu muß erwähnt werden, daß das benutzte Antiserum durch Immunisierung mit einem Konjugat aus Glukagon und bovinem Albumin gewonnen wurde.

Abb.21 zeigt den Kurvenverlauf für verschiedene Holzkohlen- und Albuminkonzentrationen

1. in Abwesenheit von Antiserum,
2. in Anwesenheit von Antiserum G 18, Endtiter 3000,
3. " Endtiter 10.

Änderungen der Holzkohle-Konzentration sind von großem Einfluß. Die größten Effekte zeigen die Kurven, wenn der Antikörper stark verdünnt und die Albuminkonzentration niedrig ist.

Der Vergleich der Holzkohlentrennung nach üblichem Schema (2,5 g% Holzkohle) mit der Alkoholfällung (Abb.22) zeigt eine Verschiebung der Ak-Verdünnungskurve um einen Titerfaktor von 20. Außerdem werden bei Antikörperüberschuß bei der Holzkohlentrennung nur submaximale Werte der %-Bindung erreicht. Bei der Alkoholfällung werden gegenüber den gewählten Bedingungen der Holzkohlentrennung somit nur 1/20 an Antiserum benötigt.

Abb.21 Unspezifische Effekte beim Glukagon-RIA - Einfluß der Holzkohlen- und Albuminkonzentration

Ordinate: % ^{125}J-Glukagon im Überstand bei Holzkohlentrennung bzw.
% ^{125}J-Glukagon im Sediment bei Alkoholfällung (Säulen im rechten Teil der Abb.)

Abszisse: Holzkohlenkonzentration in g%

Rechts zum Vergleich die Verhältnisse bei Alkoholfällung unter Standardbedingungen

Ak = G 18
1. im Überschuß
2. bei ca. 50 % Bindung in der Alkoholfällung
3. in Abwesenheit von Ak

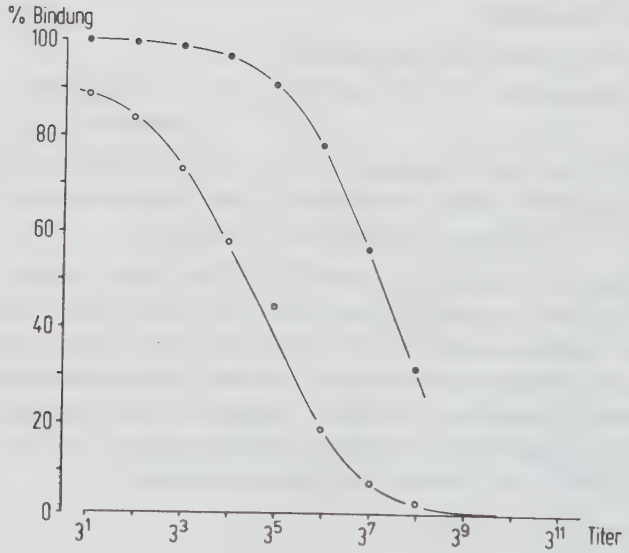


Abb.22 Holzkohlentrennung (2,5 %) und Alkoholfällung. Vergleich der Ak-Verdünnungskurven

Ak = G 4

Holzkohlentrennung o——o

Alkoholfällung ●——●

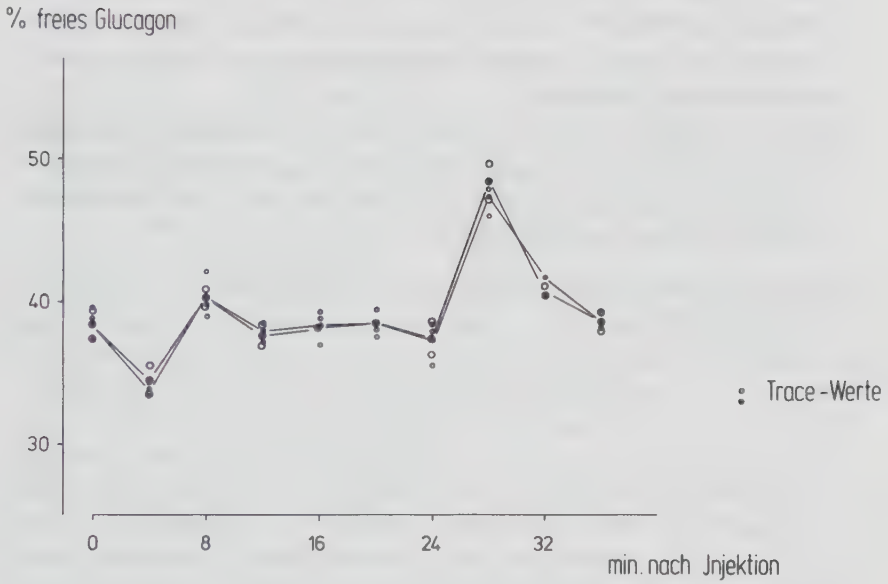


Abb.23 Glukagon-Plasmaspiegel nach Cholecystokinin-Stimulierung

Ordinate: % freies Glukagon = prozentualer Anteil von freiem ^{125}J-Glukagon der Probe, in diesem Bereich direkt proportional dem Plasma-Glukagonspiegel.

Abszisse: Minuten nach i.v.-Injektion von 300 CH Units Cholecystokinin

Die beiden Kurven erhielten wir durch Bestimmung derselben Plasmaproben an 2 verschiedenen Tagen, sie sind Ausdruck der Inter-Assay-Präzision.

4.5 Bestimmung von Plasma-Glukagon

Mit dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Glukagon-RIA wurde der Glukagon Gehalt des Plasmas beim Menschen bestimmt. Zur Testung wurde ein Cholecystokinin-Stimulierungsversuch durchgeführt. Cholecystokinin steigert den Glukagongehalt des Plasmas (Schröder et al., 1969 u. 1970; Ohneda et al., 1972).

Die Ergebnisse des Pankreocymin-Cholecystokinin-Stimulierungsversuchs zeigen (Abb.23)

1. eine weitgehende Übereinstimmung von 2 getrennten Bestimmungen der gewonnenen Plasmaproben. Dies berechtigt zu der Annahme der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen der verwandten radioimmunologischen Technik.
2. jeweils 2 Peaks mit Beginn 4 und 24 min. nach i.v. Cholecystokinin-Gabe.

5. DISKUSSION

5.1 Präparation von ^{125}J-Glukagon

5.1.1 Jodierung

Für die von Hunter u. Greenwood 1962 eingeführte Methode der Radiojodierung mittels Chloramin-T wurden im Fall des Somatotropin die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt (Greenwood et al., 1963). Im Fall des Glukagons fand Shima et al., 1975, eine schädigende Wirkung des Chloramin-T bei einer Reaktionsdauer über 30 sec unter Beibehaltung der übrigen Bedingungen, wie sie Greenwood et al. 1963 angegeben haben. Deshalb untersuchten wir die Abhängigkeit der Jodierungsreaktion von Reaktionsdauer und übrigen Variablen.

Wie Abb.2 zeigt, bestand für bestimmte Chloramin-T-Konzentrationen zu bestimmten Zeiten ein Maximum an Markierungs-Ausbeute. Bei höheren Konzentrationen war eine kürzere Reaktionsdauer nötig bis zum Erreichen der maximalen Aufmarkierung: Bei den höchsten Konzentrationen (64, 16 und 8 mM) reduzierte sich der Prozentsatz des fällbaren gebundenen ^{125}Jodids mit Überschreiten einer Zeit von 10 bzw. 30 sec. Dies ist der Konzentrationsbereich, den Shima et al. (1975) verwendeten. Die Schädigung erklärt sich durch einen Überschuß an Reaktanten.

Bei den beiden niedrigsten Konzentrationen (0,5 mM und 0,25 mM) wurde die maximale Markierungsrate der höheren Konzentrationen nicht erreicht.

Somit muß als optimal der Zeitpunkt angesehen werden, wo gerade das Maximum erreicht wird, eine Schädigung jedoch noch nicht zum Abfall des fällbaren gebundenen Jodids geführt hat, sowie die Konzentration, welche eine maximale Ausbeute bei exakt einzuhaltender Reaktionsdauer erbringt. Dies war die 1 mM Chloramin-T-Konzentration, wo 98 % Ausbeute erzielt wurden, bei einer Reaktionsdauer von 60 sec und sich im folgenden kein Abfall in fällbarem gebundenem ^{125}Jodid ergab.

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reaktion (Abb.3) fanden wir über den sauren bis neutralen Bereich konstante Ausbeuten für die verschiedenen Chloramin-T-Konzentrationen und

verschiedene Längen der Reaktionsdauer, im alkalischen stiegen die Ausbeuten bei hoher Chloramin-T-Konzentration und langer Reaktionsdauer und fielen bei niedriger Chloramin-T-Konzentration mit steigendem pH.
Für diese Diskordanz im alkalischen Milieu sind zwei Phänomene zu diskutieren:

1. Im Bereich über pH 8 werden außer Tyrosin auch andere Aminosäuren iodiert (Freedlender, 1969).
2. Andererseits sind im alkalischen Milieu Lösungen hypohalogeniger Säuren schwächer oxidierend als im sauren Milieu (Schmidt, 1967), was bei niedrigen Chloramin-T-Konzentrationen den Effekt 1. überspielt.

Nun fand Hunter, 1966, für die Jodierung von Wachstumshormon ein ziemlich scharfes pH-Optimum bei pH 7.5 mit beidseitigem Abfall der Jodierungsausbeute im Sauren und Alkalischen. Während wir einen Abfall im alkalischen Bereich für bestimmte Bedingungen bestätigen können, fanden wir im sauren für Glukagon keinen Abfall.

5.1.1.2 Reinigung von ^{125}J-Glukagon

Wie in der Einleitung erwähnt (s. 1.3.1.2), werden zur Präparation von ^{125}J-Glukagon hoher Qualität aufwendige säulenchromatographische Verfahren empfohlen, denen wir das Quso-batch-Verfahren gegenüberstellten.
Bei der Reinigung des ^{125}J-Glukagons durch die Säulenchromatographie mit Sephadex G 25 fand sich entsprechend den Befunden von Edwards et al., 1970, und Faloona u. Unger, 1974, die immunologisch höhere Qualität, gemessen am Bindungsverhalten in der Ak-Verdünnungskurve,im Anschluß an den ersten Peak. Eine scharfe Abtrennung dieser qualitativ sicher differenten Aktivität vom 1. Peak erfolgte nicht. Leider zeigten weder Edwards et al. noch Unger die Elutionskurven ihrer Trennungen auf, so daß ein Gütevergleich nicht möglich ist.
Die Reinigung durch Säulenchromatographie mit QAE-Sephadex A 25 ergab wie bei Jørgensen u. Larsen, 1972, 3 Peaks; allerdings verteilte sich die Aktivität anders auf die 3 Peaks, was jedoch durch verschiedene Markierungsbedingungen erklärt werden kann.

So hatten die Autoren ^{125}J-Glukagon einer 10 mal geringeren spezifischen Aktivität, was geringere "damaged"-Anteile erwarten läßt, und außerdem ließen sie bei der Reinigung kaltes Glukagon mitlaufen, um Adsorptionsphänomene auszuschalten. Dies sind Bedingungen, die zwar die Reinigung erleichtern, nicht aber zu einem für den RIA geeigneten markierten Protein führen.

Beim elektrophoretischen und immunologischen Vergleich (Abb.8) mit dem Quso G 32 batch-Verfahren fanden wir folgende Reihenfolge der Qualität: Quso > Sephadex G 25 > QAE-Sephadex A 25. Allerdings erreichten wir mit dem von Novo gelieferten ^{125}J-Glukagon, das nach der Methode von Jørgensen u. Larsen gereinigt wurde, praktisch identische %-Bindungen wie mit unserem Quso gereinigten ^{125}J-Glukagon, Abb.10. Dies spricht für die nicht ganz optimierte QAE-Sephadex-Reinigung in unserem Versuch einerseits, andererseits jedoch für die hohe Qualität der Quso-Reinigung. Hiervon zeugt auch die Erfüllung der 5 Qualitätsforderungen, wie sie im Ergebnisteil (S.41) aufgeführt werden.

5.2 Gewinnung von Antiglukagon-Sera

5.2.1 Antigenzubereitung

Zur Verbesserung der Immunogenität des Glukagons versuchten wir das Molekulargewicht durch Polymerisation mittels Carbodiimid zu erhöhen, welches mit vielen funktionellen Gruppen einschließlich Carboxylsäure-, Amino-, Alkohol- und Thiolgruppen unter Bildung von Amiden, Estern etc. reagiert (Khorana, 1953).
Die Molekularsiebchromatographie mit Biogel P 60 zeigte den Erfolg der Carbodiimid-Kopplung von Glukagon an Glukagon zu Molekülen mehrfachen Molekulargewichts von Glukagon selbst (Abb.11). Das Fehlen von Peaks in kurzen, gleichen Abständen, wie sie beim Vorliegen von Dimeren, Trimeren etc. zu erwarten wären, mag sich aus dem Entstehen von Harnstoffderivaten anderen Molekulargewichts als Folge von Nebenreaktionen erklären (Khorana, 1953; Goodfriend et al., 1964).

5.2.2 Serumeigenschaften (Theoretische Grundlagen s. Methodik 3.2.4)

5.2.2.1 Einfluß der Art des Immunogens

5.2.2.1.1 Titerverhalten in Abhängigkeit von der Art des Immunogens

Wie Abb.12 zeigt, führte die Immunisierung mit CDI-gekoppeltem Glukagon zu erheblich höheren Bindungskapazitäten als mit ungekoppeltem Glukagon, ein Befund, der mit den Ergebnissen von Heding, 1972, übereinstimmt. In Guanidin-HCl-Lösung lief die Reaktion offenbar besser ab als in Laktose-Lösung. Dies mag mit der höheren Glukagonkonzentration bei der Reaktion zusammenhängen, die durch die höhere Löslichkeit in Guanidin-HCl-Lösung ermöglicht wird, evtl. jedoch auch mit der Reaktion des CDI mit Laktose (Khorana, 1953).
Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nach wenigen Auffrischimpfungen kein weiterer Anstieg des Titers zu erreichen ist und sich für jede Immunogenpräparation ein spezielles Niveau einstellt. Eine Immunisierungsdauer von über einem Jahr ist beim vorliegenden Schema nicht weiter gewinnbringend in Bezug auf die Bindungskapazität des Serums; allerdings soll sich die Affinität mit zunehmender Dauer weiter erhöhen können (Heding, 1972).

5.2.2.1.2 Sensitivität in Abhängigkeit von der Art des Immunogens

Für die Sera G 18 und G 19, die wir mit Polymer II (Carbodiimid-Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung) erhielten, war die kleinste bestimmbare Glukagonmenge mit ca. 10 pg/100 µl 10fach niedriger als bei Immunisierung mit Polymer I (Sera G 4, 7, 8, p; Carbodiimid-Reaktion in Laktose-Lösung). Somit war auch hier die Reaktion in Guanidin-HCl-Lösung überlegen.

5.2.2.2 Serumeigenschaften in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme

Der Vergleich der Sera, die 10 Tage bzw. 21 Tage nach Boosterung entnommen wurden, zeigt höhere Titer und größere Sensitivität für den Zeitpunkt nach 10 Tagen (Abb.13 u. 14). Dies bestätigte die Annahme von Hurn u. Landon (1971), die den Zeitpunkt nach

10 Tagen als optimal für die Serumgewinnung ansahen; sie läßt jedoch Praktiken als ungeeignet erscheinen, bei denen nach Boosterung über Wochen und Monate Blut abgenommen wird.

5.2.2.3 Die Sera G 18 und G 19 im Vergleich zu K 964
(Theoretische Grundlagen siehe unter Methodik)

5.2.2.3.1 Ak-Verdünnungskurve (Bindungskapazität)

Die Titer, bei denen 50 % Bindung erreicht wurde (Abb.15), sind für G 19 40.000, für G 18 7.000 und für K 964 1.200. Diese Werte und die hohe %-Bindung von 99 % legen die hohe Bindungskapazität der von uns entwickelten Sera dar.

5.2.2.3.2 Inkubationszeit (Avidität)

Während die %-Bindung (Abb.16) für G 18 und Heding-Ak K 964 etwa bis zu 24 h nach Inkubationsbeginn noch signifikant zunahm, zeigte G 19 erheblich höhere Avidität, die Plateauphase war bereits nach ca. 7 h erreicht. Dies ist bislang die kürzeste Inkubationszeit, die für einen Anti-Glukagon-Ak beschrieben wurde.

5.2.2.3.3 Standardkurve (Sensitivität)

Die Linearität der Standardkurven (Abb.17) von G 19 und K 964 im Bereich unter 100 pg/100 µl weist die beiden Ak als geeignet aus für die Bestimmungen von Glukagon im Plasma.
Der etwas steilere Verlauf bei K 964 spricht für geringgradig höhere Sensitivität.

5.2.2.3.4 Scatchard plot (Affinität)

Dies kommt auch in der Auftragungsweise des Scatchard-plots (Abb.18) zum Ausdruck, wo wir eine Gleichgewichtskonstante K = 12.8 ng^{-1} für K 964 und K = 4.08 ng^{-1} für G 19 ermittelten. Die Affinität beider Ak liegt jedoch in ähnlichem Bereich wie schon die Parallelität der Ak-Kurven (Abb.15) andeutete (Berson u. Yalow, 1964).
Die Linearität der Scatchardplots spricht für das Vorliegen einer einzigen Antikörperspezies (Odell et al., 1971) oder den vorherrschenden Einfluß eines Ak im Arbeitsbereich.

Sensitivität im Konzentrationsbereich von Plasmaglukagon:
Bei der Untersuchung verschieden stark verdünnter Plasmaextrakte konnten wir sowohl mit G 19 wie G 18 verschieden hohe Plasmaglukagonkonzentrationen unterscheiden. Auch hier besaß G 19 die überlegeneren Eigenschaften. Unspezifische Effekte sind hierbei durch die Extraktion des Plasmas mit Äthanol weitgehend ausgeschlossen, da die Plasmaproteine so vorher gefällt worden sind, insbesondere auch die Globuline, die nach Weir et al. (1973) manchmal unspezifische Effekte hervorrufen können.

5.2.2.3.5 "Spezifität"

Wir untersuchten die Ak G 18 und G 19 auf Kreuzreaktivität mit allen bekannten Hormonen der Glukagonfamilie (Abb.19a und b). Enteroglukagon I, das einzige bisher vollständig identifizierte Hormon der GTG-Reihe (s. Tab.3b), steht immunologisch stellvertretend für die ganze Reihe (Holst, 1978). Die fehlende Kreuzreaktivität mit ihm reicht für die Feststellung "spezifischer Glukagon Ak" aus. Da reines Enteroglukagon I benutzt wurde, ist der Bezug auf Gewichtseinheiten möglich und nicht der Umweg über Äquivalent-Gewichte nötig wie bei ungereinigten Extrakten.

Die fehlende Verdrängung von ^{125}J-Glukagon aus der Ak-Bindung durch die verwandten Hormone berechtigt, die beiden Antikörper G 18 und G 19 als "spezifische-Glukagon-Antiseren" (s.Einleitung) zu klassifizieren. Sie müssen gegen die C-terminale Aminosäuresequenz 24-29 pankreatischen Glukagons gerichtet sein (Assan u. Slusher, 1972), die das Enteroglukagon I nicht enthält.

GIP, VIP und Sekretin ergaben auch in 10.000-facher Menge der kleinsten bestimmbaren Glukagonmenge keine Verdrängung von ^{125}J-Glukagon aus der Ak-Bindung. Beim Enteroglukagon I konnte wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge nur bis zum 100-fachen Überschuß getestet werden; in diesem Bereich war ebenfalls keine Verdrängung zu sehen. Somit muß eine Kreuzreaktivität von 1 % angenommen werden, was die Antiseren G 18 und G 19 in die Reihe der wenigen bisher entwickelten "spezifischen Glukagon-Antiseren" stellt (Tab.5).

Tab.5: Übersicht der bisher beschriebenen sog. spezifischen Anti-Glukagon-Seren

Autor	getestete Präparate	% Kreuzreaktivität+	getestet von
Eisentraut et al.,1968	ungereinigtes Darmextrakt	0,25 %	(Eisentraut et al.,1968)
		2,5 %	(Valverde et al.,1970)
	Enteroglukagon I	0,5 %	(Schenk, 1977)
Heding,1969	Enteroglukagon I	0,2 %	(Sundby et al., 1967)
Holst et Aasted,1974	ungereinigtes Darmextrakt	1,0 %	(Holst et Aasted,1974)
Schenk,1977	Enteroglukagon I	0,7 %	(Schenk, 1977)

+ Definition s.u. 3.2.4.3

Bemerkenswert ist, daß die gewonnenen spezifischen Antiseren anderer Autoren Einzelfälle aus einer großen Zahl unspezifischer Antiseren waren. In unserem Fall führte die Immunisation von 4 Kaninchen nach der beschriebenen Methode der Polymerisation von Glukagon in Guanidin-HCl-Lösung zum Tod von 2 Kaninchen. Die beiden Überlebenden lieferten die spezifischen Antiseren G 18 und G 19. Somit ist eine hohe Ausbeute an spezifischen Seren bei Anwendung dieser Methode wahrscheinlich.

5.3 Unspezifische Effekte

Wie eingangs erwähnt (s. Einleitung I.4), ist für die Bewertung einer Methode zur Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem Glukagon die Beeinflussung durch unspezifische Proteineffekte ausschlaggebend. Die Möglichkeit ihrer Elimination bestimmt die Wahl zwischen den beiden verbreiteten Methoden der Alkohol- und Holzkohlentrennung.

5.3.1 Holzkohlentrennung - Abhängigkeit von Holzkohlen- und Albuminkonzentration

Für die Holzkohlentrennung wurden von verschiedenen Autoren teils widersprüchliche Ergebnisse gefunden (Buchanan u. Mc Carroll, 1971

bzw- Luyckx, 1972), zumindest jedoch unterschiedliche Bedingungen, bei denen sich unspezifische Effekte minimal auswirkten (Tab.6). Der unspezifische Effekt von Proteinen bei der Holzkohlentrennung wird erklärt mit der Adsorption von AgAk-Komplexen (Hunter u. Ganguli, 1971).
Optimal sei die Konzentration an Protein bei Holzkohle, wo einerseits nicht zuviel AgAk gebunden, andererseits freies Ag vollständig adsorbiert wird. Außerdem wird der Holzkohle auch noch mehr als der Alkoholfällung die Möglichkeit zugesprochen, Ag aus der Ak-Bindung beim Trennungsvorgang (Daughaday u. Jacobs, 1971) zu lösen. Ein protektiver Proteineffekt wäre denkbar.

5.3.1.1 Bedeutung von geschädigtem ^{125}J-Glukagon

Der parallele Verlauf der Kurven von Leerwerten und Prozent im Überstand bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in Abb.20 läßt jedoch am ehesten an ein Phänomen denken, das unabhängig ist von der AgAk-Interaktion, die effektive Prozentbindung bleibt konstant.
Ein weiterer Hinweis für die Unabhängigkeit von der Antigen-Ak-Reaktion wird geliefert durch die Identität der Ergebnisse bei Zugabe des Albumins vor der Inkubation und direkt bei der Trennung, wie wir sie beobachteten. Im übrigen hat Aquilar-Parada et al., 1969, bei längerer Einwirkungszeit von Holzkohle keine Dissoziation von Glukagon-Komplexen beobachtet.
Die Sättigungskinetik (Abb.20) mit einem Maximum von 9 % spricht wiederum dafür, daß an diesem Phänomen nur ein begrenzter fixer Teil der Aktivität - eben 9 % - teilhat. Dieser Anteil wird auch bei Antikörperüberschuß nicht gebunden, wie Ak-Verdünnungskurven zeigten.
Nun wandert geschädigtes Glukagon im Gegensatz zu intaktem in der Elektrophorese mit Albumin (Luyckx, 1972). Es drängt sich so die Vermutung auf, die 9 % der Aktivität seien geschädigtes Glukagon, das nicht mit dem Antikörper reagiert, wohl aber von Albumin gebunden werden kann. Der Proteineffekt besteht somit in einem Konkurrenz- bzw. Verteilungsphänomen zwischen freiem Albumin und Albumin-beschichteter Holzkohle. Tatsächlich führten wir die Versuche in einem Stadium durch, in dem eine Optimierung der

Markierung noch nicht erreicht und durch die Markierung "geschädigte" Glukagon-Moleküle noch nicht vollständig eliminiert werden konnten.
Diese Möglichkeit wird bei der Interpretation der unspezifischen Proteineffekte von den Untersuchern, die sich hiermit beschäftigt haben, nicht angeführt, obwohl entsprechende Kurvenverläufe aufgezeigt werden (Buchanan u. Mc Carroll, 1971; Luyckx, 1972).

Buchanan u. Mc Carroll (1971) erhielten bei Anwesenheit von Protein in konstanter Konzentration (1 g/%) bei variabler Holzkohlenkonzentration ebenfalls annähernd parallele Kurven für Glukagon. Dabei entsprechen die Konzentrationen unseren Versuchsbedingungen.
Auch Luyckx (1972) fand bei einer Untersuchung mit verschiedenen Serumprotein- und Holzkohlenkonzentrationen bei Zugabe von nur 50 µl bovinem Serum mit steigenden Holzkohlenkonzentrationen einen parallelen Abfall von Leerwert und Prozent im Überstand. Die Untersuchung bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ergab: Bei Anwesenheit von höheren Holzkohlenmengen hängen die Leerwerte von der Proteinkonzentration ab, sie steigen bis zu 20 %; bei niedrigeren Holzkohlenmengen ist dieser Sättigungswert über den gesamten untersuchten Bereich der Proteinkonzentrationen schon erreicht.
So läßt sich bei näherem Hinsehen auch bei Untersuchungen der genannten Autoren ein Sättigungseffekt erkennen. Die hohen Leerwerte von 20 % und die geringe % B/T von nur 60 % bei Antikörperüberschuß (Endverdünnung 1:25) sprechen für einen relativ hohen Anteil des geschädigten ^{125}J-Glukagons an der Gesamtaktivität, die Luyckx benutzte. Dies unterstützt die Vermutung bezüglich der Rolle des geschädigten ^{125}J-Glukagons bei diesem Phänomen.

5.3.1.2 Bedeutung der Adsorption von AgAk-Komplexen an Holzkohle

In der Untersuchung, die Abb.21 zeigt, wird das Phänomen der Adsorption von AkAg-Komplexen deutlich. Während in Abwesenheit von Ak und bei hoher Antikörperkonzentration nahe dem Überschuß (Endtiter 10) der Prozentsatz der Radioaktivität im Überstand mit zunehmender Albumin-Konzentration und abnehmender Holzkoh-

Die Untersuchung mit bovinem Albumin (Abb.20) zeigt einen überproportionalen Anstieg der % im Überstand gegenüber den Leerwerten bei zunehmender Albuminkonzentration. Am ehesten ist dies wohl darauf zurückzuführen, daß hier ein Antikörper verwendet wurde, der durch die Immunisierung mit einem Konjugat aus Glukagon und bovinem Albumin gewonnen wurde. In Anwesenheit des Albumins wird Glukagon offenbar leichter gebunden. Bei der häufigen Verwendung von Albumin als Kopplungssubstanz ein nicht unerheblicher Befund.

5.4 Plasma-Glukagon nach Cholecystokinin-Stimulierung

Zur Beurteilung der Eignung des RIA-Systems zur Plasma-Glukagon-Bestimmung stimulierten wir die Glukagon-Freisetzung einer Versuchsperson mit 2 HE Pankreozymin (von Boots) pro kg Körpergewicht intravenös. Die beiden Kurven der Abb.23 resultierten aus der Bestimmung des Glukagonspiegels derselben Proben an zwei verschiedenen Tagen. Ihre Deckungsgleichheit belegt die gute Reproduzierbarkeit der Methode.
Der Kurvenverlauf, den wir nach i.v.-Gabe von Cholecystokinin-Pankrezymin fanden (Abb.23), stimmt überein mit den Ergebnissen, die Schröder et al. 1969/70 bei entsprechendem Versuchsaufbau erhielten; auch er fand den Hauptpeak nach einer langen Latenzzeit von max. ca. 20 Min. und einem kleinen Peak nach ca. 9 Min. Selbst am isolierten perfundierten Pankreas der Ratte bestätigte sich die verzögerte Glukagonfreisetzung bei Versuchen der gleichen Arbeitsgruppe (Fussgänger et al., 1969).
Dazu im Gegensatz stehen Ergebnisse von Iversen (1971) am isolierten perfundierten Hundepankreas und von der Arbeitsgruppe von Unger. Iversen fand einen Glukagonanstieg nach 10 sec; die Arbeitsgruppe von Unger nach 3 min, wobei sie Cholecystokinin Hunden endoportal verabreichten und das Blut der vena pancreaticoduodenalis untersuchten (Unger et al., 1967, 1979; Ohneda u. Eisentraut, 1968a).
Bei Untersuchungen des peripheren Venenbluts am Menschen und i.v.-Gabe von Cholecystokinin erhielten sie unterschiedliche Resultate je nach Dosierung des Cholecystokinins. Bei Gabe von

300 CH Units wurde ein kleiner Peak nach 3-10 min gefunden, bei Gabe von 1 CH Unit/kg kein signifikanter Glukagonanstieg (Ohneda et al., 1972).
Da wir bei gleicher Dosierung wie Schröder et al. ein entsprechendes Ergebnis fanden, bei unterschiedlichen Dosierungen unterschiedliche Antworten resultierten, selbst von ein- und derselben Arbeitsgruppe, mag tatsächlich eine Dosisabhängigkeit der Antwort vorliegen.

II. GLUKAGON-PLASMASPIEGEL BEI POLYTRAUMATISIERTEN

1. EINLEITUNG

1.1 Glukagon - ein Stresshormon

Während andere Hormone, wie ACTH, Kortikoide und Katecholamine, schon seit langem als Stresshormone gelten (Selye, 1936 u. Selye u. Dosne, 1941), ist eine ähnliche Bedeutung für Glukagon erst in jüngerer Zeit diskutiert worden.
Es fanden sich erhöhte Glukagonwerte bei Infektionen und Fieber (Santeusiano et al., 1972; Bloom, 1973a), verschiedenen Formen von Schmerzen (Bloom et al., 1973a,b,c), Fetal Distress (Johnston, 1973), körperlicher Anstrengung (Böttger et al., 1972; Fehlig et al., 1972), Myokardinfarkt (Laniado et al., 1973; Willerson et al., 1974), Verbrennungen (Lindsey et al., 1972), Trauma (Meguid et al., 1972; Lindsey et al., 1972) und hämorrhagischem Schock (Halmagyi et al., 1969). Bei allen Zuständen dieser Art besteht ein erhöhter Bedarf an Energie, die Stickstoffbilanz ist negativ. Glukagon wirkt glykogenolytisch, lipolytisch, glykoneogenesesteigernd und erscheint somit geeignet für die Regulation im Sinne der metabolischen Anforderungen der Stresssituation.

Nun wirken andere Stresshormone wie Katecholamine und Glucocorticoide ganz entsprechend, ihr Anteil am Metabolismus läßt sich nur schwer von einem eventuellen Glukagoneffekt unterscheiden. Im übrigen stimulieren diese Hormone direkt und indirekt die Freisetzung von Glukagon. Dies konnte für Katecholamine (Iversen, 1971, Leclercq-Meyer et al., 1971, Gerich et al., 1972) nachgewiesen werden, sowie für Glucocorticoide (Marco et al., 1973, und von Wise et al., 1973)

Im Tierversuch konnte die Erhöhung von Glukagonspiegeln im hämorrhagischen Schock durch ß-Blocker (Lindsey et al., 1974 b u. 1975) und Ganglienblocker teilweise, jedoch nicht völlig, reduziert werden. Das weist auf die Bedeutung des sympathicoadrenergen Systems für die Glukagonfreisetzung hin. In welchem Umfang hierbei nervale Komponenten beteiligt sind, blieb bisher unklar.

Ebenso unklar ist die Rolle nicht-hormoneller Faktoren, wie Hämokonzentration und verminderter Glukagon-Abbau als Folge der Nieren-, Leber- und Muskelperfusionsstörungen. Jedenfalls konnte Lefebvre et al. (1974, 1975, 1976a) nachweisen, daß grundsätzlich ein Ausfall der Niere zu Glukagonspiegelanstiegen führt.

Nun ist die Traumatisation ein komplexes Geschehen, bei welchem verschiedene Stressformen eine Rolle spielen. Für die Komponenten Schmerz, Gewebeschädigung und Schock konnte jeweils isoliert die Potenz der Glukagonspiegelerhöhung festgestellt werden. Bei den unterschiedlichen Stressformen sind differente Wirkungsmechanismen der Glukagonfreisetzung und -wirkung denkbar und durch einige Untersucher wahrscheinlich gemacht worden.
So lösen Schmerzreize eine sofortige massive Glukagonfreisetzung aus (Bloom et al., 1973a,b,c). Bei Entblutung ohne Trauma steigen die Glukagonspiegel erst nach 20 min langsam an (Lindsey et al., 1975). Ein Vergleich von Myokardinfarkt mit Pektangina ohne Infarkt und Cardiogenem Schock bei Infarkt zeigt unterschiedliche Reaktionsmuster (Willerson et al., 1974).

1.2 Ziel der Studie

Um Näheres über die Faktoren der Glukagonspiegelerhöhung und die Rolle des Glukagon im Polytrauma zu erfahren, setzten wir hier den Glukagonspiegel im Verlauf nach der Traumatisation in Beziehung mit potentiellen Modulatoren von Glukagon einerseits und mit Parametern seiner Wirkungsaktivität andererseits.

Während dies bisher erst für Glukose und Insulin geschehen ist (Lindsey et al., 1972 u. 1974; Meguid et al., 1972 u. 1973), wurde in dieser Studie eine Anzahl zusätzlicher Faktoren untersucht.

Gegenüber den Voruntersuchungen anderer Autoren, bei denen nur 1 bis höchstens 3 Meßpunkte über die Zeit gewonnen wurden, verfolgten wir die Glukagonspiegel im Verlauf von 5 Tagen in 8 Intervallen, so daß eine Aussage über eventuelle Korrelationen mit anderen Parametern eher möglich war und der großen Dynamik des akuten Krankheitsbildes mehr Rechnung getragen wurde.

Außerdem erfolgte die erste Blutentnahme am Unfallort und nicht

erst bei der Ankunft in der Klinik, wie dies bei bereits vorliegenden Publikationen der Fall ist (Meguid et al., 1972; Lindsey et al., 1974). Damit konnten die Untersuchungen erheblich vorverlagert werden, was bei dem unterschiedlichen Reaktionsmuster in der Frühphase von Stresseinwirkungen besonders wichtig erscheint.
Zugleich wurde durch den schnellen Einsatz ärztlicher Maßnahmen frühzeitig den Mechanismen der Schockauslösung und -unterhaltung entgegengewirkt. Von Interesse war hier, inwiefern sich dies auf Glukagon auswirkte.

2. MATERIAL UND METHODIK[+)]

2.1 Patientengut

Zur Auswahl der Verletzten mußte der Studie eine Definition eines Polytraumas zugrundegelegt werden. Aus den unterschiedlichen Beschreibungen der Literatur (Macik, 1966; Hartel, 1973; Koslowski et al., 1976; Kroupa, 1972; Gögler, 1971; Kremer u. Sailer, 1971) legten wir für die vorliegende Untersuchung eine Definition fest, die sowohl lokale wie allgemeine Schädigungen berücksichtigt:

Ein Polytrauma liegt dann vor, wenn unabhängig vom Schweregrad der einzelnen Verletzungen gleichzeitig zwei oder mehrere Traumatisationen erfolgten, von denen eine die Extremitäten und die anderen Schädel, Abdomen bzw. die darin befindlichen Organe betreffen. In jedem Fall kommt es zur Ausbildung eines traumatisch-hämorrhagischen Schocks.

Tab.7: Einteilung der polytraumatisierten Verletzten

Schweregrad I	Verletzungen an mindestens 2 Organen oder Organsystemen, z.B. ausgedehnte Kontusionen, große und tiefe Wunden, Frakturen, Schädelhirntrauma I.Grades. Schockindex 1,0
Schweregrad II	Verletzungen an mindestens 2 Organen oder Organsystemen, wie unter I, jedoch z.B. ausgedehnte Wunden, Frakturen großer Röhrenknochen, Rippenserienfrakturen, Schädelhirntrauma II.Grades. Deutlicher Schockzustand, Index 1,2
Schweregrad III	Verletzungen an mindestens 2 Organen oder Organsystemen wie unter II, jedoch z.B. große Wunden und Blutungen, Trümmer- und Kompressionsfrakturen, Thorax- und Abdominalverletzung mit Organrupturen, Schädelhirntrauma III.Grades. Schwerster Schockzustand. Schockindex 1,5 und mehr

modifiziert nach Schweiberer und Sauer

+) Die klinischen Untersuchungen führte Herr Dr. Sefrin vom Anästhesiologischen Institut durch. Ihm verdanken wir die Überlassung der Plasmaproben und aller klinisch-chemischen Meßdaten, die wir zu Glukagon in Beziehung setzten.

Die Verletzten wurden nach einer Modifikation der Klassifizierung von Schweiberer u. Sauer (1974) 3 Schweregraden zugeordnet. Das benutzte Schema zeigt Tab.7. Insgesamt konnten von März 1974 bis Dezember 1976 71 Polytraumatisierte untersucht werden, 55 männlich, 16 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 29 $\pm$ 16 Jahre, wobei der Jüngste 3 und der Älteste 75 Jahre alt war.

Plasmaglukagon-Bestimmungen wurden bei den 14 Patienten durchgeführt, die im zeitlich letzten Abschnitt der Studie untersucht wurden. Die Verteilung auf die 3 Schweregrade entsprach dem Krankengut der Gesamtstudie: 18 % waren leicht, 36 % mittel und 46 % schwer polytraumatisiert.

2.2 Ablauf der Untersuchungen

Die Blutentnahmen erfolgten aus der vena cubitalis über eine Braunüle^{R} oder aus der vena subclavia bzw. cava superior über einen Polyäthylenkatheter. Die erste Blutentnahme (1) wurde am Unfallort vorgenommen nach dem Eintreffen des Notarztes, unmittelbar vor dem Anlegen einer intravenösen Infusion. Im Durchschnitt betrug die Rettungszeit 15 Minuten, wobei 35,2 % der Verletzten bereits zehn Minuten nach dem Trauma durch den Notarzt behandelt werden konnten, 60 % innerhalb von 15 Minuten. War eine Rettungszeit von 20 Minuten überschritten, so wurde auf die erste Entnahme verzichtet, um den definierten Zeitraum von 20 Minuten posttraumatisch einhalten zu können.

Unter Rettungszeit ist die Zeit von der Notfallmeldung bis zum Eintreffen des Rettungspersonals am Unfallort zu verstehen; unter Einlieferungszeit der Zeitraum von der Meldung bis zur Ankunft im Krankenhaus. Sie betrug im Mittel 44 Minuten.
Die weiteren Blutentnahmen erfolgten 1 Stunde (2), 3 Stunden (3), 7 Stunden (4), 12 Stunden (5), 24 Stunden (6), 36 Stunden (7) und 5 Tage (8) nach dem Unfall.

2.3 Therapeutische Maßnahmen im Untersuchungszeitraum

Die Behandlung setzte mit dem Eintreffen des Notarztes am Unfallort ein und wurde auf der Fahrt im Notarztwagen fortgesetzt. Ne-

ben den allgemeinen Maßnahmen der ersten Hilfe wurde sofort eine Schocktherapie mit Hämaccel^{R} (500-1000 ml), Halbelektrolyt- und Plasmaproteinlösungen begonnen.
Nach Aufnahme in der Klinik wurde die Schockbehandlung und die operative Erstversorgung nach den allgemeingültigen Richtlinien durchgeführt.
Im einzelnen wurden hierbei folgende Prinzipien beachtet:

1. Ausgleich der Hypovolämie	
2. Sauerstoffversorgung	(Respirationstherapie)
3. Aufrechterhaltung des Säure-Base-Haushalts	(Na-Bikarbonat, Tris-Puffer)
4. Verbesserung der Mikrozirkulation	(10.000 IE Heparin/12 U)
5. Spezielle Medikamente	a) Dehydrobenzperidol bzw. Hydergin bei Weiterbestehen einer Vasokonstriktion trotz ausreichender Volumenauffüllung b) Glukokortikoide (Solu-Decortin^{R} 30 mg/kg KG c) Digitalis
6. Operative Versorgung	

2.4 Bestimmungsmethoden

I. Blutbild

Die Bestimmungen wurden mit dem Coulter Computer Modell S der Firma Electronics Ltd. Dumstable, Bedfordshire, England, durchgeführt.

II. Serumanalysen

Die Bestimmungen wurden durchgeführt mit einem Autoanalyzer (SMA 12/30 und SMA 6/60) der Firma Technicon, Frankfurt, einem Enzymautomaten (Nr. 5020) und einem Photometer (Nr. 1110) der Firma Eppendorf, Hamburg.

1. Natrium/Kalium
   Flammenphotometrie

Norm: Na 135-145 mVal/l
K 3,5-5,0 mVal/l

2. Kalzium
nach Kessler u. Wolfmann (1961)
Norm: 8,5-10,5 mg/100 ml

3. Kreatinin
nach Chasson et al. (1961)
Norm: altersabhängig

4. Glukose
Dialyse gegen NaCl, Reduktion von Cu^{++} zu Cu^{+}, Kolorimetrie des Chelatkomplexes mit Neocuproin
Norm: 65-110 mg/100 ml

5. Cholesterin
Liebermann-Buchard-Methode, modifiziert nach Huang et al. (1961)

6. Triglyceride
Modifikation der Methode von Carlson u. Wadström (1959), nach Royer und Ko. (1969)
Norm: 50-200 g/100 ml

7. Gesamteiweiß
Biuret modifiziert nach Weichselbaum (1946)
Norm: 6,0-8,0 g/100 ml

8. Albumin
nach Ness et al. (1965)
Norm: 4,2-5,2 g/100 ml Männer
3,9-5,0 g/100 ml Frauen

9. Harnstoff-N
nach Marsh et al. (1959)
Norm: 10-20 mg/100 ml

III. Blutgasanalysen

Die Bestimmung erfolgte mit dem Mikroanalysensystem AVL 937 der Firma AVL-AG, Schaffhausen, Schweiz, aus einer Blutprobe aus dem hyperämisierten Ohrläppchen.

IV. Hormonbestimmungen

Glukagon:

RIA mit dem Antikörper K 964 von L. Heding, der als pankreasspezifisch angesehen wird (Heding, 1971, 1972) nach der oben beschriebenen Methode:

Norm: 200 $\pm$ 25 pg/ml Plasma

Insulin:

RIA mit dem Reagenziensatz der CIS-Gruppe (Sorbin Gruppo Radiochimica Saluggia, Italien)

Norm: 5-35 µU/ml Plasma

Katecholamine:

Bestimmung nach Passau u. Peuler (1973)

Norm: Adrenalin 90 pg/ml Plasma
Noradrenalin 200 pg/ml Plasma

Cortisol:

RIA nach Foster u. Dunn (1974) mit dem Reagenziensatz der Fa. Clinical Assays, Inc. Cambridge, Mass., USA

Norm: 50-250 µg/ml Plasma

3. ERGEBNISSE

3.1 Blutbild

3.1.1 Leukozyten (Abb.24a)

In allen Schweregraden besteht bereits am Unfallort eine Leukozytose. Ein weiterer Anstieg ist nur im Schweregrad II signifikant nachweisbar ($p < 0,01$). Durchweg folgt ab der 3. h ein Abfall bis zur 24. h, dann stabilisieren sich die Werte auf verschiedenen Niveaus. In Schweregrad II und III besteht eine leichte Leukozytose, in I. liegen die Werte im Normbereich.

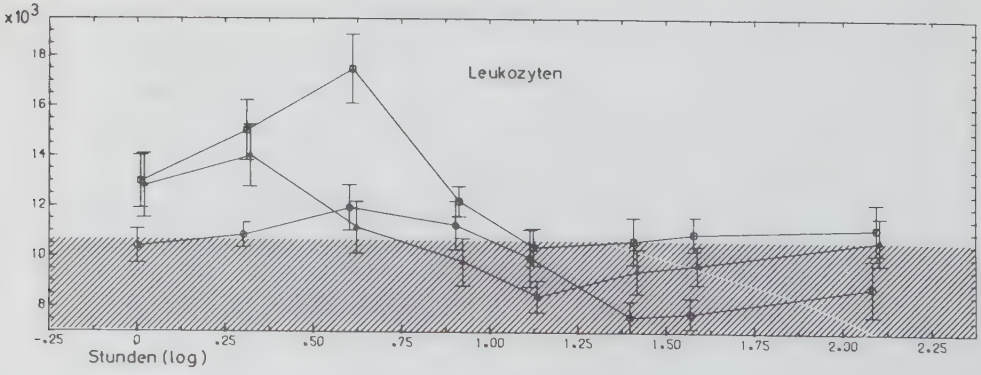
Abb.24 Blutbildveränderungen nach Polytrauma

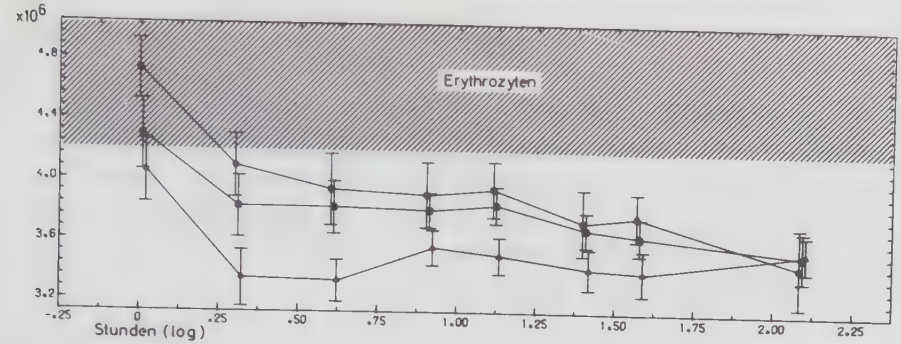
a) Leukozyten/µl
b) Erythrozyten/µl
c) Hämoglobin (g%)
d) Hämatokrit (%)
e) HbE (pg)

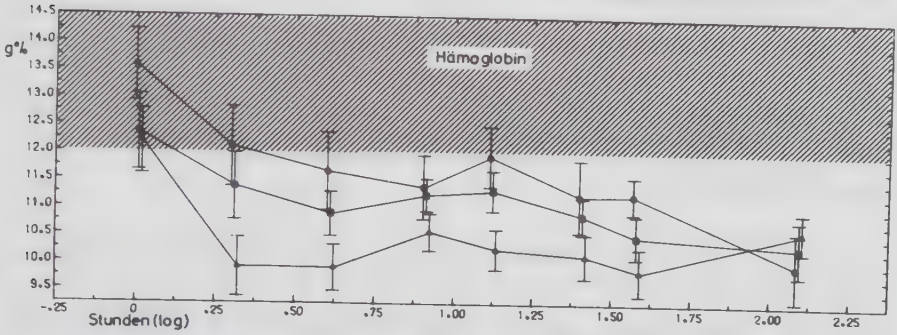
Schweregrad I o——o , II □——□ , III ▲——▲

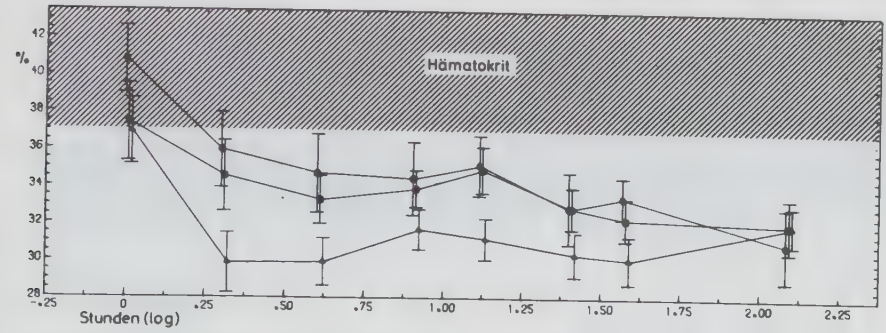
Entnommen aus Habilitationsschrift von Dr. Sefrin, Würzburg, 1977

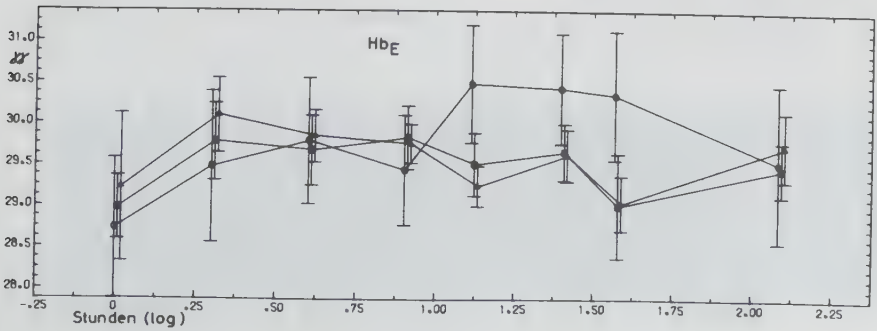
a)




x10⁶
Erythrozyten
Stunden (log)


g%
Hämoglobin
Stunden (log)


%
Hämatokrit
Stunden (log)


Hb_E
Stunden (log)

3.1.2 Erythrozyten (Abb.24b)

In allen Schweregraden fallen die Erythrozytenzahlen bis zur 3. h signifikant ab ($p < 0,05$) unter die Normgrenze und zeigen insgesamt bis zum 5. Tag sinkende Tendenz. Im Schweregrad III steigen sie nach 7 h vorübergehend an. Im Vergleich liegen die Werte bei höherem Schweregrad tiefer.

3.1.3 Hämoglobin (Abb.24c)

Der Hb-Wert entspricht den Erythrozytenzahlen.

3.1.4 Hämatokrit (Abb.24d)

Auch der Hk entspricht dem Verhalten von Erythrozytenzahlen und Hämoglobinwerten.

3.1.5 HbE - mittlerer Hämoglobingehalt im einzelnen Erythrozyten (Abb.24e)

In allen Schweregraden und zu allen Entnahmezeiten im Normbereich.

3.2 Wasser- und Elektrolythaushalt

3.2.1 Natrium (Abb.25a)

Die Werte liegen zu allen Entnahmezeiten bei allen Schweregraden im Normbereich. Insgesamt besteht eine langsam fallende Tendenz. Ein signifikanter Abfall bis zur 1.Stunde ist als Verdünnungseffekt zu sehen.

3.2.2 Kalium (Abb.25b)

Die Ausgangswerte liegen noch im Normbereich, jedoch mit zuneh-

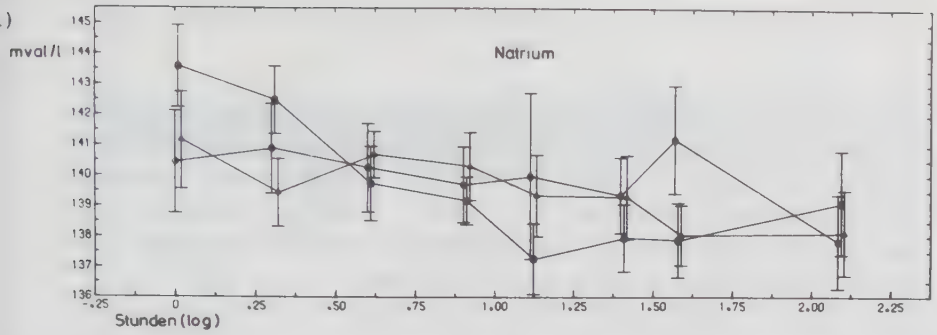
---

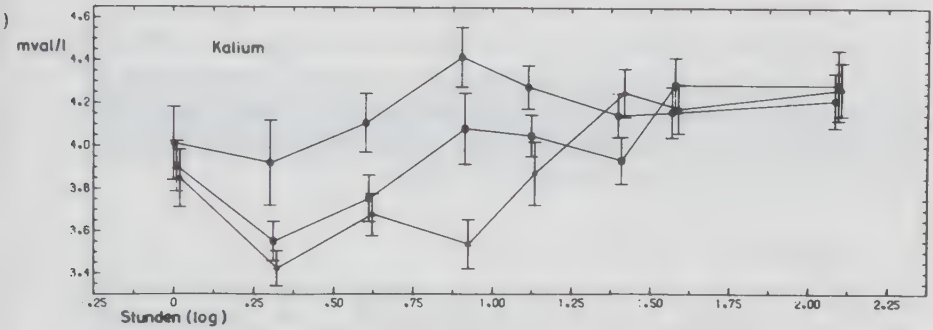
Abb.25 Wasser- und Elektrolythaushalt nach Polytrauma

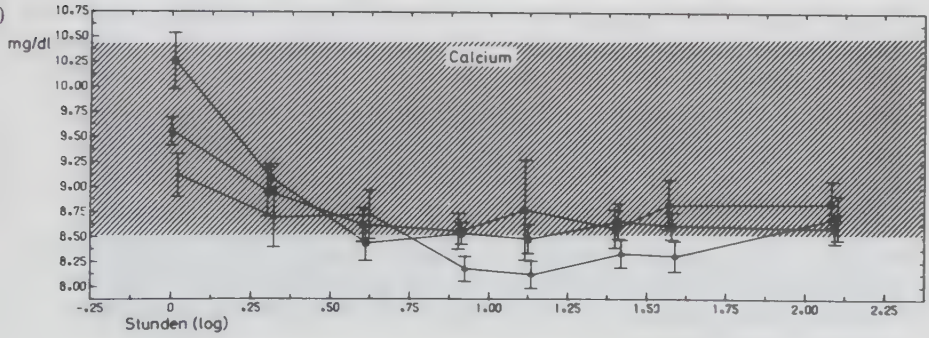
a) Natrium (mval);
b) Kalium (mval);
c) Calcium (mg/100 ml);
d) Kreatinin (mg/dl)

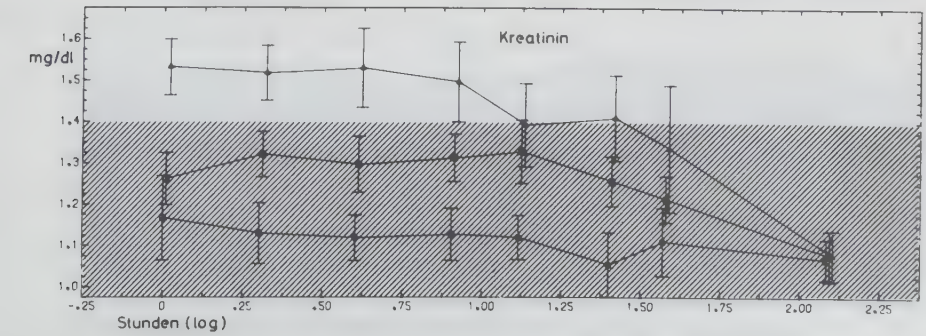
Schweregrad I o——o , II □——□ , III ▲——▲

Entnommen aus der Habilitationsschrift Dr. Sefrin, Würzburg, 1977


mval/l
Natrium
Stunden (log)


mval/l
Kalium
Stunden (log)


mg/dl
Calcium
Stunden (log)


mg/dl
Kreatinin
Stunden (log)

mendem Schweregrad niedriger. Nach 1 h sind die Werte deutlich abgefallen; im Schweregrad II und III signifikant und unter den Normbereich. Nach 3 h steigen die Werte wieder an und erreichen im Schweregrad I nach 3 h, in II nach 7 h und in III nach 12 h den Normbereich. Nach 24 h unterschieden sich die Kaliumwerte aller Schweregrade nicht mehr voneinander.

3.2.3 Calcium (Abb.25c)

Wie beim Kalium liegen die Calciumwerte am Unfallort im Normbereich und mit zunehmendem Schweregrad niedriger. Sie fallen in den ersten 3 h deutlich ab, überschreiten jedoch nur im Schweregrad III die untere Grenze der Norm und stellen sich alle auf einen Pegel im unteren Normbereich ein.

3.2.4 Kreatinin (Abb.25d)

Als Indikator der Nierenfunktion im Schock empfehlen Commichau (1973) und Klütsch (1972) das Serumkreatinin. Wir sind uns der Einschränkung der Aussagekraft dieses einzigen Parameters bewußt, verzichteten jedoch aus Gründen der Durchführbarkeit auf Clearance-Untersuchungen.
Während im Schweregrad I und II alle Werte im Normbereich liegen, sind sie im Schweregrad III in den ersten 12 h erhöht. Für die ersten 36 h zeigen die Kurvenverläufe jeweils keine signifikante Änderung. Im Vergleich zum 5. Tag sind jedoch die Werte des III. Schweregrades signifikant erhöht. Außerdem weisen die Kurven eine Fächerung nach dem Schweregrad auf. Somit besteht zumindest für Schweregrad III die Frage einer schockbedingten Nierenfunktionsstörung zur Diskussion.

3.3 Säure-Base-Haushalt

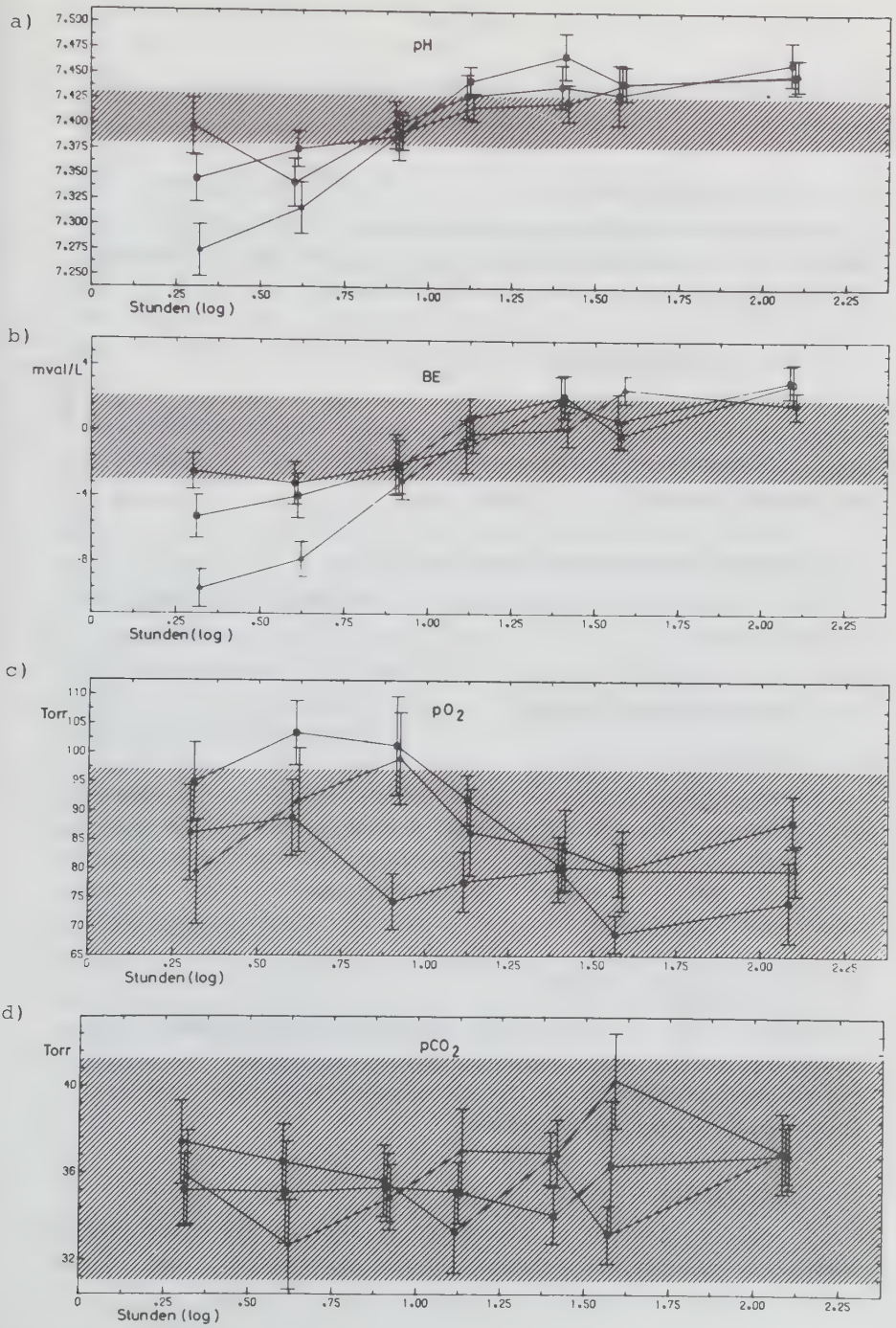
3.3.1 pH-Wert (Abb.26a)

In allen Schweregraden steigen die pH-Werte innerhalb des Norm-

---

Abb.26 Säure-Base-Haushalt nach Polytrauma
a) pH-Wert; b) Base-Excess (mval/l); c) Sauerstoffpartialdruck (Torr); d) Kohlendioxyd-Partialdruck (Torr)
Schweregrad I; o——o; II □——□; III ▲——▲;
Entnommen aus der Habilitationsschrift Dr. Sefrin, 1977

Abb. 26


a)
pH
7.500
7.475
7.450
7.425
7.400
7.375
7.350
7.325
7.300
7.275
7.250
0
.25
.50
.75
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
2.25
Stunden (log)
b)
mval/L
BE
0
-4
-8
Stunden (log)
c)
Torr
pO2
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
Stunden (log)
d)
Torr
pCO2
40
36
32
Stunden (log)

bereichs an. Nur im Schweregrad III liegt das pH bis 1 h nach dem Trauma mit 7.274 außerhalb der Norm.

3.3.2 Base-Excess (Abb.26b)

Die Werte korrelieren mit dem Schweregrad: - 2,5 Grad I, - 5,3 Grad II, - 9,7 Grad III am Unfallort. Sie steigen im weiteren Verlauf an.

3.3.3 Sauerstoffpartialdruck (Abb.26c)

Die Werte des Schweregrads I liegen von der 1. bis zur 7. h niedriger als die übrigen. Ansonsten ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar; die Verletzten atmeten teils spontan, teils wurden sie beatmet.

3.3.4 Kohlendioxyd-Partialdruck (Abb.26d)

Die Werte liegen alle im Normbereich, signifikante Änderungen bestehen nicht.

3.4 Stoffwechselparameter

3.4.1 Glukose (Abb.27a)

Die Glukosewerte steigen um so schneller und höher, je schwerer die Traumatisation. Im Schweregrad I dauert der Anstieg sieben, in II drei, in III eine Stunde. Es folgt ein kontinuierlicher Abfall bis zum 5. posttraumatischen Tag, wobei jedoch die Werte immer noch signifikant ($p < 0,01$) über dem Normbereich liegen.

3.4.2 Cholesterin (Abb.27b)

Vom Ausgangswert, der bei allen Schweregraden im Normbereich liegt, fallen die Werte durchweg ab, um so stärker, je schwerer die Traumatisation ist. Am 5. posttraumatischen Tag sind die Blutspiegel wieder angestiegen.

3.4.3 Triglyceride (Abb.27c)

Die Spiegel fallen von Werten um 130 stetig ab mit einem Minimum nach 12 h, das für den Schweregrad III am tiefsten liegt. Dann

steigen die Spiegel wieder zu den Ausgangswerten bis zum 5. Tage an.

3.4.4 Gesamteiweiß (Abb.27d)

Das Gesamteiweiß fällt in allen Schweregraden ab. In Schweregrad II und III ist das Minimum nach 3 h erreicht, bei I erst nach 12 h. Auch die Ausgangswerte korrelieren mit dem Schweregrad, auch wenn sie noch im Normbereich liegen. Nach Erreichen des Minimums steigen die Eiweißwerte langsam wieder an.

3.4.5 Albumin (Abb.27e)

Der Verlauf der Werte ähnelt dem des Gesamteiweißes.

Zum Vergleich der beiden Größen wurde der prozentuale Anteil gegenüber dem Ausgangswert eines jeden Schweregrades errechnet. Er wurde zugleich in Beziehung gesetzt zu den entsprechend aufgestiegenen Werten des Hämoglobins und Hämatokrits.

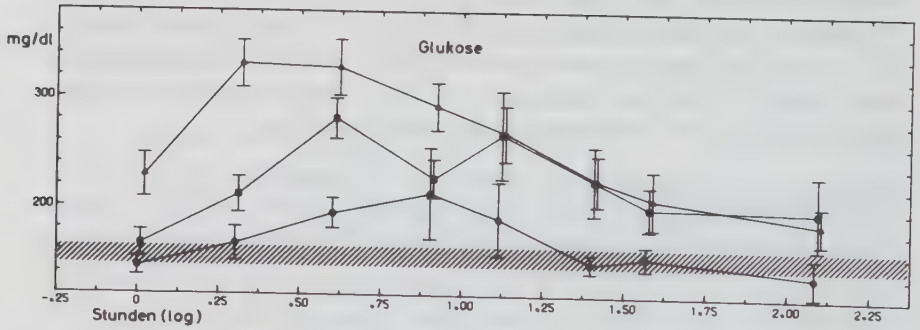
Der anfängliche Abfall der Protein- und Albuminwerte verläuft denen von Hämoglobin und Hämatokrit parallel. Der später zu sehende Wiederanstieg der Werte fällt für Albumin deutlich geringer aus als für das Gesamteiweiß.
Auffallend war, daß im Schweregrad III die Eiweißwerte steiler anstiegen als in II. Wie eine genauere Aufschlüsselung von Proteinverlusten und exogener Zufuhr ergab, ist dies auf eine höhere Zufuhrrate an Proteinen zurückzuführen.

3.4.6 Harnstoff-N

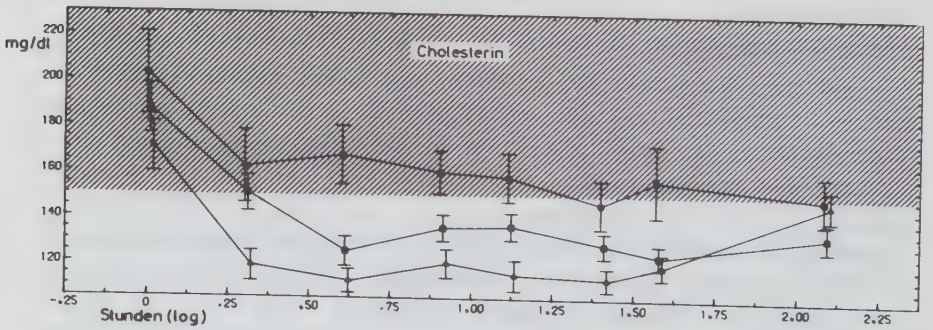
Die Werte liegen im gesamten Verlauf bei allen Schweregraden im Normbereich. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Schweregraden fehlen.

Abb.27

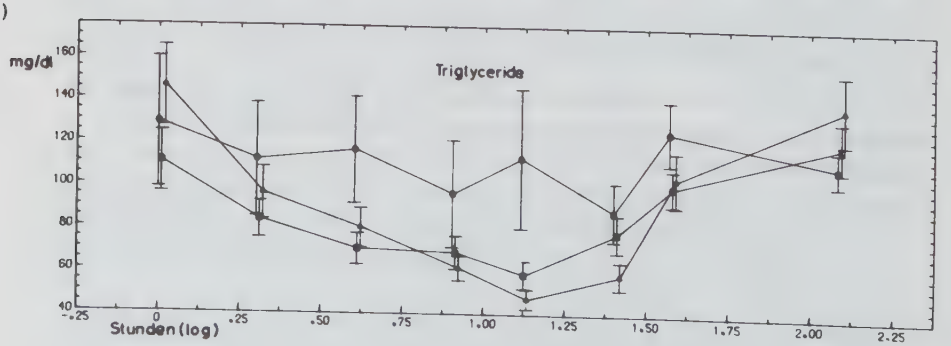
a)


mg/dl
Glukose
300
200
-.25
0
.25
.50
.75
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
2.25
Stunden (log)

b)


mg/dl
Cholesterin
220
200
180
160
140
120
-.25
0
.25
.50
.75
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
2.25
Stunden (log)

)


mg/dl
Triglyceride
160
140
120
100
80
60
40
-.25
0
.25
.50
.75
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
2.25
Stunden (log)

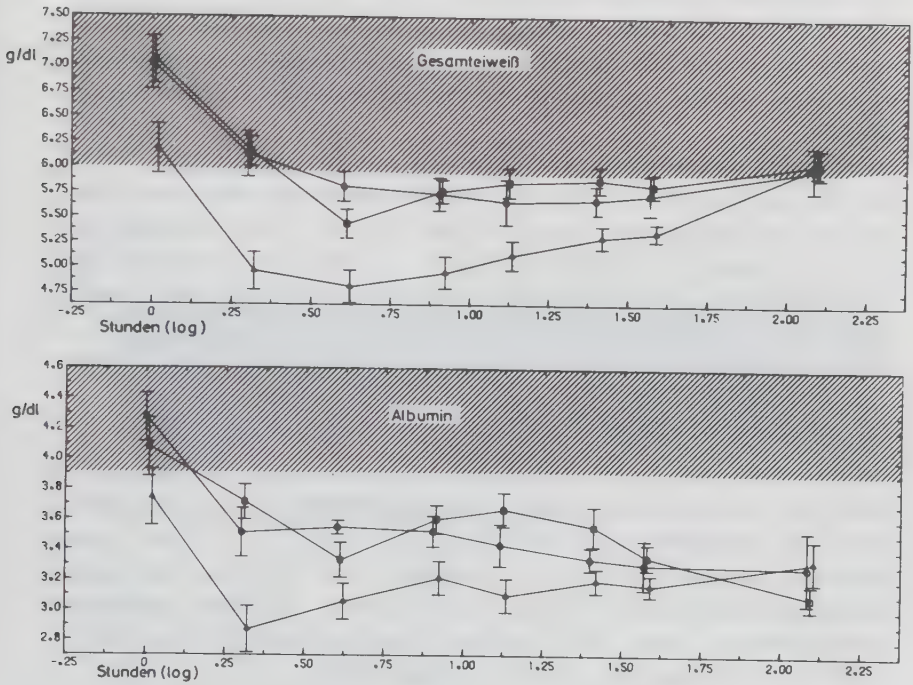


Abb.27 Stoffwechselparameter nach Polytrauma

a) Glukose (mg/100 ml)
b) Cholesterin (mg/100 ml)
c) Triglyceride (mg/100 ml)
d) Gesamteiweiß (g/100 ml)
e) Albumin (g/100 ml)

Schweregrad I o——o ; II □——□ ; III ▲——▲

Entnommen aus der Habilitationsschrift von Dr. Sefrin, Würzburg, 1977

3.5 Hormone

3.5.1 Glukagon (Abb.28a)

Da die Anzahl der untersuchten Fälle in den einzelnen Schweregraden zu gering ist (n=14), um eine statistische Aussage machen zu können, wurden nur die Werte des gesamten Kollektivs herangezogen.
Zu allen Entnahmezeiten sind die Glukagonspiegel erhöht. Schon am Unfallort um 277 % (mit 554 pg/ml) erheblich über der Norm von 200 pg. Auf diesem Pegel blieben die Werte mit allenfalls leicht steigender Tendenz bis zur 7. h. Nach 12 h folgt nochmals ein Anstieg mit dem Maximum bei 24 h bzw. 36 h (460 % der Norm). Am 5. posttraumatischen Tag sind die Werte wieder abgefallen, liegen jedoch noch deutlich über der Norm mit 612 pg/ml Plasma.

3.5.2 Insulin (Abb.28b)

Die Insulinwerte liegen insgesamt im Normbereich. Sie zeigen jedoch eine steigende Tendenz und liegen nach 5 Tagen signifikant über dem Ausgangswert am Unfallort ($p < 0,01$).
Zwischen Glukose, Insulin und Glukagon war mit Hilfe des doppelten U-Tests keine Korrelation feststellbar. Vereinzelte Negativkorrelationen fanden sich zwischen Insulin und Glukosewerten, waren jedoch insgesamt nicht aussagekräftig.

3.5.3 Adrenalin (Abb.28c)

Auch hier wurden wegen der geringen Anzahl der Untersuchten (n= 11) nur die Werte des Gesamtkollektivs herangezogen.
Bereits am Unfallort liegt Adrenalin mit 360pg/ml Plasma um 300 % über der Norm und steigt bis zur 1. h auf ca. 900 % der Norm.

Abb.28 Hormonspiegel nach Polytrauma

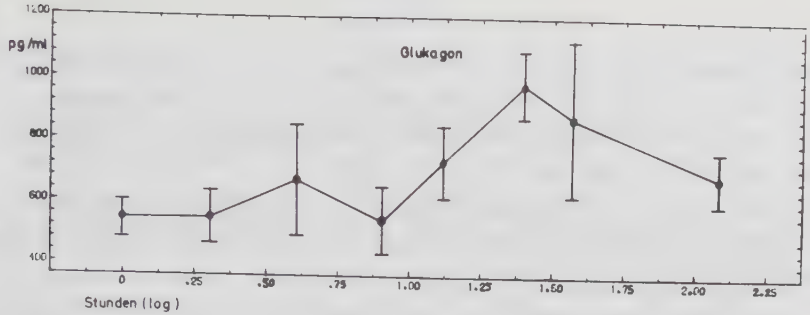
a) Glukagon (pg/ml Plasma);
b) Insulin (µU/ml Plasma);
c) Katecholamine (pg/ml Plasma);
d) Kortisol (1g/ml Plasma)

Schweregrad I o——o ; II □——□ ; III ▲——▲

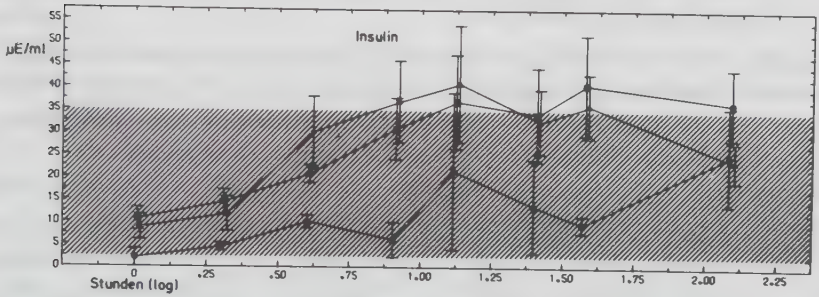
Entnommen aus Habilitationsschrift von Dr. Sefrin, Würzburg, 1977

Abb. 28

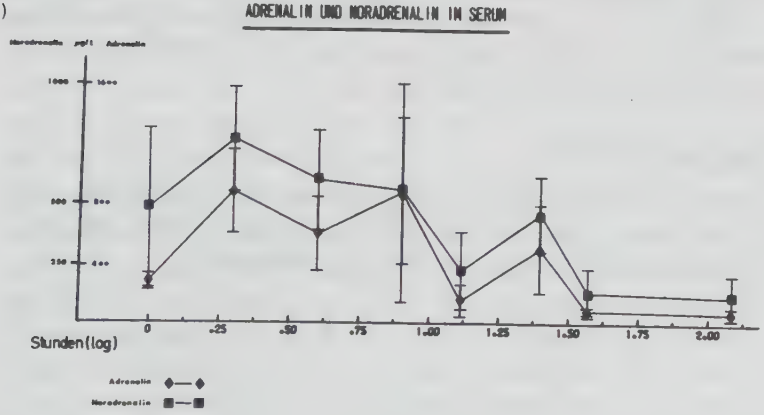
a)


pg/ml
Glukagon
Stunden (log)

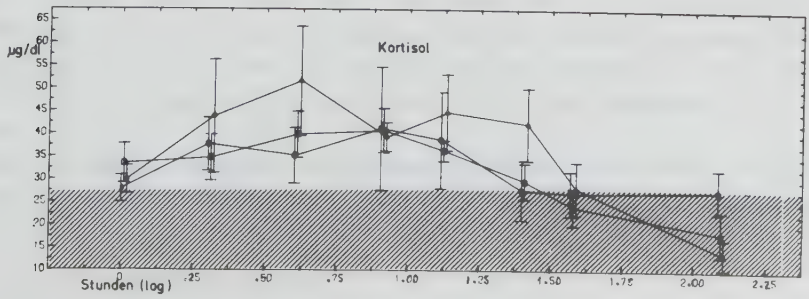
b)


µE/ml
Insulin
Stunden (log)

c)


ADRENALIN UND NORADRENALIN IN SERUM
Stunden (log)
Adrenalin
Noradrenalin

d)


µg/dl
Kortisol
Stunden (log)

Auf diesem Niveau halten sich die Werte bis zur 12. h, dann fallen sie ab. Nach 36 h sind die Werte auf ein Niveau abgefallen, das auch am 5. posttraumatischen Tag gemessen wird, jedoch immer noch 87 % über dem Normwert liegt.
Die große Streuung der Werte der 7. h sind auf die Gabe von Dopamin zu diesem Zeitpunkt bei den Patienten Nr.68 und 69 zurückzuführen.

3.5.4 Noradrenalin (Abb.28c)

Wie bei Adrenalin war hier die Zahl der Untersuchten n=11. Der Kurvenverlauf ähnelt dem von Adrenalin. Bezogen auf die prozentuale Erhöhung der Werte gegenüber dem Normwert liegen die Adrenalinwerte jedoch höher, steigen bis zur 1. h steiler an und halten sich auf diesem Niveau bis zur 7. h, während Noradrenalin bereits am Unfallort maximal ausgeschüttet wird, bis zur 1. h nur noch 100 % ansteigt und dann abfällt. Bei der Untersuchung auf eine Korrelation zwischen Adrenalin bzw. Noradrenalin und Glukose fand sich für das Paar Adrenalin und Glukose vom Entnahmezeitpunkt 1 bis 5 eine Übereinstimmung, für Noradrenalin und Glukose nur zum Zeitpunkt 2 und 3.

3.5.5 Cortisol (Abb.28d)

Hier liegen die Werte am Unfallort bereits über dem Normbereich, steigen bis zur 3. h an und fallen dann kontinuierlich ab. Am 5. posttraumatischen Tag liegen sie im Normbereich.

4. DISKUSSION

4.1 Glukagonspiegel - Verlauf im Vergleich zu Untersuchungen anderer Autoren

Wie sämtliche Untersucher vor uns (Lindsey et al.,1972 u. 1974, Meguid et al., 1972 u. 1973), haben wir eine Hyperglukagonämie im Polytrauma gefunden. Ein quantitativer Vergleich der Spiegel ist jedoch nur unter Einschränkung möglich wegen methodischer Differenzen:

1. Verwendung eines anderen RIA-Systems (Ak = K 30 v. R.H. Unger),
2. differentes Patientengut (Verletzungsmuster, Schweregradverteilung - s. Tab.8),
3. verschiedene, z.T. nicht exakt definierte Entnahmezeitpunkte (s. Tab.8).

Trotz dieser Unterschiede liegt die prozentuale Erhöhung der Spiegel gegenüber der Norm in der gleichen Größenordnung: In dem Zeitraum der ersten 48 Stunden, für den Voruntersuchungen vorliegen, wurden von Lindsey et al. (1974a u.b) mittlere Erhöhungen um 550 - 700 % der Norm gefunden (s. Tab.8), von Meguid et al. (1972 u. 1978) mit dem gleichen Antikörper Erhöhungen um ca. 300 - 1000% der Norm (s. Tab.7). Bei unseren Untersuchungen fanden wir in diesem Zeitraum Anstiege um 280 - 460 % der Norm.

Bei der Sichtung der Voruntersuchungen nach dem Kriterium verschiedener Entnahmezeiten fällt das durchweg höhere Niveau der 24 Stunden-Werte auf, gegenüber den Werten der ersten Stunde (s. Tab.8). So gibt Lindsey et al. 1974 bei Entnahme innerhalb von 3 h posttraumatisch 328 $\pm$ 65 pg/ml an gegenüber 410 $\pm$ 116 bei Entnahme innerhalb von 48 h in der Studie von 1972, und Meguid et al. 1972 und 1973 bei Aufnahme in die Klinik bzw. 6 h posttraumatisch 209 $\pm$ 9 bzw. 259 $\pm$ 49 gegenüber 466 $\pm$ 89 und 572 $\pm$ 125 nach 24 h an. Dies bestätigt den Kurvenverlauf unserer Studie, wo wir nach einem Plateau während der ersten 7 h 12 h posttraumatisch einen erneuten Anstieg der Werte registrieren konnten.
Wie wir zeigen konnten, ist dieses erste Plateau schon am Unfallort erreicht - also im Durchschnitt 15 Minuten posttraumatisch.

Tab.8: Glukagonspiegel im Trauma - Ein Vergleich der verschiedenen Studien

Untersucher	Lindsey et al., 1972		Lindsey et al., 1974		Meguid et al., 1972		Meguid et al., 1973		eigene Ergebnisse
Art der Verletzung	?		Stich- u. Schußverletz., wenig Verkehrsunfälle		Schuß-, Weichteil-Fraktionen, Verbrennungen		Schußverletz. Frakturen Verbrennungen		Polytrauma (Verkehrsunfälle)
Schweregrad Zahl	leicht 5	schwer 4	leicht 12	schwer 8	leicht 5	schwer 6	leicht 8	schwer 7	14
Glukagon-Spiegel (pg/ml)									
bei Aufnahme							±	209	
0,25									554
1									566
3			224	482					668
6					±	259			
7									555
12									710
24					±	466	±	572	922
36									885
48	291	558							
120									612
Normbereich	57 ± 3		98 ± 11		50 - 300		50 - 300		200 ± 25

Stunden nach Trauma

Dies ist insofern bemerkenswert, als die Herbeiführung eines hypovolämischen Schocks durch Exsangination an Hunden erst nach 15 Minuten zum Anstieg von Glukagon führt und sich in den folgenden 35 Minuten stetig fortsetzt bis zur 50. Minute (Lindsey et al., 1975 und 1974b).
Im bisher beim Polytrauma nicht untersuchten Bereich nach 48 h sahen wir bis zum 5. Tag posttraumatisch erhöhte Werte, wenn auch mit fallender Tendenz. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die bei chirurgischen Patienten gefunden wurden (Lindsey et al., 1974a u.b; Giddings et al., 1974, 1975a,b; Russel et al., 1975) sowie nach Verbrennungen (Lindsey et al., 1972; Wilmore et al., 1973).
Wegen der geringen Anzahl der Untersuchten können wir, wie Lindsey, keine statistisch erhärtete Aussage über einen Einfluß des Schweregrades der Verletzung auf die Glukagonspiegel geben, wenn auch die Mittelwerte für eine Zunahme der Werte mit dem Schweregrad in beiden Untersuchungen sprechen (s. Tab.8).

4.2 Glukagonspiegel in Abhängigkeit anderer Parameter

4.2.1 Glukose

Hypoglykämie stimuliert die Glukagonfreisetzung in vivo und in vitro (Unger et al., 1962; Aquilar-Parada et al., 1969), Hyperglykämie hemmt sie (Foa, 1972; Gerich et al., 1974; Ohneda et al., 1969, 1972). Obwohl die Nüchternglukosespiegel im Wirkungsbereich für die Glukagon-Suppression liegen und Glukose Glukagon effektiver hemmt als sie Insulin stimuliert (Weir et al., 1974), bewirkt Glukopenie in vitro keine andauernde Freisetzung, was die Bedeutung anderer Faktoren für die Modulation der basalen Glukagonsekretion in vivo unterstreicht (Gerich et al., 1976b). Nun ist seit den Untersuchungen von Bernard 1877 eine Hyperglykämie in der posttraumatischen Phase bekannt und vielfach bestätigt und in Zusammenhang mit dem Schweregrad von Schock und Verletzung gebracht worden (Cannon, 1915; Green et al., 1949; Howard, 1955; Carey et al., 1970; Jordan et al., 1972; Lindsey et al., 1975). Auch wir fanden erhöhte Glukosewerte über den gesamten Zeitraum.

Trotzdem wurde die Hyperglukagonämie im Schock von einigen Autoren mit einer Hypoglykämie ursächlich in Zusammenhang gebracht. So fand Halmagyi et al., 1969, bei Schafen im Anschluß an eine dreistündige Hypovolämie eine Stunde nach Reinfusion des verlorenen Bluts einen signifikanten Glukoseabfall und einen Glukagonanstieg. Allerdings zeigt die Durchsicht seiner Ergebnisse im Stadium des Blutverlustes erhöhte Blutzucker- und Glukagonwerte, was Halmagyis Schlußfolgerung eher unwahrscheinlich werden läßt. Hypoglykämien im Schock wurden lediglich an internistischen Patienten beobachtet mit protrahiertem cardiogenen oder septischen Schock (Rackwitz et al., 1974). Den beschriebenen Hypoglykämien bei experimentellem hämorrhagischen Schock (Drucker et al., 1969; Hift u. Strawitz, 1961) gingen immer erhöhte Werte voraus, so daß bei Übertragung auf den Menschen ein präfinaler Zustand angenommen werden mußte, was in der vorliegenden Studie an Polytraumatisierten nicht im Vordergrund stand.
Wilmore et al. (1973) fanden bei Verbrennungen innerhalb der ersten 48 Stunden zwar zueinander korrelierte Werte im Sinne einer von ihnen angegebenen Formel (Plasmaglukagon (pg/ml) = 10.1 + 0.95 Urinkatecholamine (pg/24 U) - 0.52 Plasmaglucose (mg/100 ml). Insgesamt waren jedoch beide Parameter erhöht; dies spricht allenfalls für eine Modulation der Glukagonspiegel durch die Blutzuckerwerte.
In unserer Polytraumatisiertenstudie war eine solche Korrelation jedoch nicht nachweisbar, obwohl wir im Gegensatz zu Wilmore zu mehreren und definierten Zeitpunkten Blut entnommen haben. Für das Polytrauma scheint somit eine gefundene Hyperglukagonämie von der Regulation durch den Blutzuckerspiegel abgekoppelt zu sein. So lassen sich die Ergebnisse der Traumatisationsstudien anderer Autoren erklären (Lindsey et al., 1972 u. 1974; Meguid et al., 1972 u. 1973), die eine ausgeprägte Hyperglukagonämie trotz Hyperglykämie und exogener Glukosezufuhr fanden.

4.2.2 Aminosäuren

Aminosäuren stimulieren die Freisetzung von Glukagon aus dem Pankreas (Assan et al., 1967; Ohneda et al., 1968; Unger et al., 1970; Müller et al., 1971; Rocha et al., 1972). Arginin besitzt

die größte Wirkung beim Menschen, Alanin und Glycin sind weniger effektiv (Müller et al., 1971 u. 1975; Wise et al., 1973). Tatsächlich ändert sich das Aminosäuremuster im Serum von Traumatisierten. Alanin steigt leicht, Glycin bleibt unverändert (Levenson et al., 1955). Die Aminosäuren stammen aus dem posttraumatischen Proteinkatabolismus und dienen der Glucogenese. Die vielfach beschriebene, posttraumatische Hypo- und Dysproteinämie mit einem Abfall von Gesamteiweiß und Albumin als schnell verfügbarem Eiweiß (Cuthbertson, 1942; Bauer u. Schultis, 1966; Davies, 1970; Birke et al., 1960) läßt sich jedoch nicht allein auf eine erhöhte katabole Rate zurückführen. Vielmehr müssen zusätzlich berücksichtigt werden: Hämodilution, Blutverlust, Eiweißabstrom in die Wundgebiete (Davies, 1970). Der weitgehend parallele Abfall von Gesamteiweiß, Albumin, Hb und Hk in den ersten Stunden des Untersuchungszeitraums spricht für das Überwiegen des Einflusses von Blutverlust und Hämodilution in dieser Phase. Ein evtl. schon zu diesem Zeitpunkt bestehender Eiweißabbau wird durch diese massiven Einwirkungen überdeckt.

Deutlich wird er erst später aus dem gegenüber dem Gesamteiweiß verzögerten Anstieg von Albumin (Abb.28) unter exogener Eiweißzufuhr: Wie Birke et al. 1960 und Davies 1970 für das Polytrauma und Euerbäck et al. 1959 für experimentelle Stressformen zeigten, dient unter den Plasmaproteinen bevorzugt Albumin der Aminosäurebereitstellung, während die Akute-Phase-Proteine der $alpha_1$- und $alpha_2$-Globulinfraktion vermehrt gebildet werden.

Eine posttraumatische Störung der Albuminsynthese in der Leber scheint nur geringe Bedeutung zu haben (Hart u. Lick, 1964). Somit ist der verminderte Anstieg des Albumins wohl tatsächlich als Hinweis auf einen vorhandenen Katabolismus zu werten, zumal die verabreichten Proteinlösungen in Form von Blut und Plasmaproteinlösung insgesamt eher erhöhte Albuminanteile aufwiesen.

Für eine Aussage über Aminosäurespiegel und deren Korrelation zu Glukagonwerten ist dieser Parameter zu ungenau. Außerdem erscheinen die beschriebenen Veränderungen der Aminosäurespiegel im Trauma (Levenson et al., 1955) bei der gleichzeitig vorhandenen ausgeprägten Hyperglykämie zu gering, um die massive Gluka-

gonspiegelerhöhung erklären zu können; bei hohen Glukosespiegeln ist nämlich die Freisetzung von Glukagon durch Aminosäuren vermindert und für eine gleichzeitig geforderte Erhöhung der Insulinfreisetzung auf Aminosäuren findet sich in unserer Studie kein Anhalt, bei Insulinwerten im Normbereich trotz Hyperglykämie.
Gegen einen Einfluß der Aminosäuren spricht weiterhin, daß in den Untersuchungen von Lindsey et al. (1972) und Meguid et al. (1972 u. 1973) etwa gleich große Glukagonerhöhungen gefunden wurden, obwohl diese nur Glukoselösungen infundierten, wir jedoch auch Aminosäurelösungen.

4.2.3 Lipide

In der Stressituation des Traumas werden freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe nach Lipolyse freigesetzt; eine Erhöhung des Blutspiegels ist die Folge (Birke et al., 1963; Meng, 1972). Da erhöhte Spiegel freier Fettsäuren zu einer Hemmung der Glukagonfreisetzung führen (Edwards u. Taylor, 1970; Luyckx u. Lefebvre 1970; Gerich et al., 1974; Gross u. Mialhe, 1974), scheiden sie als ursächlicher Faktor der Hyperglukagonämie im Trauma aus.

Triglyceride stimulieren die Glukagonfreisetzung, allerdings am meisten, wenn sie aus dem Darm resorbiert werden, weniger bei intravenöser Applikation und nur bei Normoglykämie (Unger u. Orci, 1976).
Während in der Literatur sowohl erhöhte (Burkhardt, 1970; Huth, 1971) als auch erniedrigte (Rokkanen et al., 1974) Triglyceridspiegel beschrieben werden, bewegten sie sich in unserer Studie entsprechend den Befunden von Birke, 1963, und Hausdörfer et al., 1976, im Normbereich bei fallender Tendenz (Abb.27c). Somit kann die gefundene Hyperglukagonämie nicht kausal mit den Triglyceridspiegeln in Zusammenhang gebracht werden. Eine eindeutige Wirkung von Cholesterin auf die Glukagonfreisetzung ist nicht beschrieben. Eine Interpretation dieses Parameters entfällt somit.

4.2.4 Elektrolyte

Natrium

Bisher liegen nur für Insulin (Hales u. Milner, 1968), nicht jedoch für Glukagon Untersuchungen vor, die eine Abhängigkeit der Spiegel von den Natriumwerten aufzeigen.

Kalium

Hyperkaliämien von mehr als 5,9 mval führen an Hunden zu erhöhter Glukagonfreisetzung (Santeusiano et al., 1973). Dies beruht offenbar auf einer direkten Stimulation der Alpha-Zellen (Kuzuya et al., 1974). Wie Abb.25b zeigt, werden jedoch potentiell stimulierende Werte von mehr als 5.9 mval im gesamten Untersuchungsintervall nicht annähernd erreicht, sie sind im Gegenteil anfangs sogar erniedrigt.

Calcium

Wie in vitro Versuche am isolierten perfundierten Pankreas (Bathena et al., 1976) bzw. an der Zellkultur von Inselzellen (Wollheim et al., 1976) zeigten, hat ein Calciumspiegel von 15.2 mval (Bathena) bzw. $>$ 10 mval (Wollheim) glukagonstimulierenden Effekt; im Bereich $<$ 10 mval fand Wollheim et al. jedoch keinen Effekt. Die in unserer Studie gefundenen niedrigen Calciumwerte (s. Abb. 25c) erklären die Hyperglukagonämie folglich nicht.

4.2.5 Sympathikoadrenales System

Adrenerge Nerven (Bloom et al., 1973; Esterhuizen et al., 1970; Kaneto et al., 1975; Marliss et al., 1973; Malaisse, 1972; Porte et al., 1973; Woods u. Porte, 1974) sowie Adrenalin und Noradrenalin selbst (Gerich et al., 1972,1973,1974; Iversen, 1971; Leclercq-Meyer et al., 1971; Lundquist 1971,1972a,b; Porte et al., 1966) fördern die Glukagon- und hemmen die Insulinfreisetzung, während der Parasympathikus die Glukagon- und Insulinausschüttung fördert (Kaneto et al., 1974).
Nun ist eine Stimulierung des sympathikoadrenergen Systems im Schock verschiedener Genese seit langem bekannt (Bernauer et al., 1971; Holtz u. Palm, 1966; Hockfelt et al., 1962; Manger et al., 1957; Millar u. Benfey, 1958; Saito, 1928) und auch beim Poly-

trauma im besonderen beschrieben (Jäättelä, 1972 u.1975; Johnston, 1973; Young, 1956).
Tatsächlich wurde der Glukagonanstieg im experimentellen hämorrhagischen Schock durch Beta-Blockade (Lindsey et al., 1974 b u.1975) sowie durch komplette autonome Blockade mit Ganglienblockern und Atropin (Halmagyi et al., 1969) reduziert, wenn auch nicht vollkommen.
Während Wilmore et al. 1973 eine Korrelation zwischen Plasma Glukagonspiegeln und Urinkatecholaminen aufzeigte, konnte Halmagyi et al., 1969, beim hämorrhagischen Schock keine Beziehung zu Plasmaadrenalinspiegeln finden. Die Aussage beider Untersuchungen ist jedoch nicht unbedingt auf das Polytrauma anwendbar und eingeschränkt durch methodische Mängel: So war Halmagyis RIA nicht spezifisch für pankreatisches Glukagon, die Nüchtern-Normalwerte recht hoch, die Plasmaspiegel nicht im Zeitverlauf dokumentiert. Wilmore beschränkte sich ebenfalls auf einen Wert innerhalb der ersten 48 Stunden, ohne den Entnahmezeitpunkt exakt zu definieren.
In unserer Studie liegen Glukagon wie die Katecholamine vom ersten Entnahmezeitpunkt am Unfallort bis nach 7 h auf einem erhöhten Niveau, eine Korrelation der einzelnen Werte im Verlauf läßt sich jedoch nicht nachweisen, so daß ein zusätzlicher modulierender Faktor neben den Katecholaminen postuliert werden muß. Nach 7 h fallen Adrenalin und Noradrenalin parallel mit der Beseitigung desVolumenmangels ab, Glukagon jedoch steigt zu noch höheren Werten an. Dies stimmt mit den tierexperimentellen Befunden Halmagyis (1969) im hämorrhagischen Schock überein, wo nach Reinfusion des endogenen Bluts höhere Glukagonspiegel gefunden wurden als im Stadium des Blutverlustes.
Da der Abfall der Katecholamine die Beseitigung der Volumenmangelsituation signalisiert (Hardaway, 1968; Jäättelä, 1972 u. 1975), mag dieser Glukagonanstieg auf der Verbesserung der Pankreasperfusion beruhen, bei weiterhin über der Norm liegenden Katecholaminen.
Allerdings wurde unter körperlicher Anstrengung ein ähnliches Verhalten dieser Hormone gefunden: Unter kurzer Belastung korrelieren Glukagon- und Katecholaminwerte, nach längerer Dauer (80

min) erfolgt ein weiterer Anstieg von Glukagon ohne entsprechende Katecholaminerhöhung. Dies spricht für das Hinzutreten eines weiteren Stimulanz der Glukagonfreisetzung; eine Zunahme der Pankreasperfusion unter den Bedingungen der körperlichen Erschöpfung kommt kaum in Betracht.

Zur Differenzierung von nervaler und adrenaler Komponente wurden bisher nur Hinweise in der Literatur geliefert. So fanden Luyckx u. Lefebvre, 1973, in der Anfangsphase des Stresses physischer Belastung eine komplette Verhinderung der Glukagonfreisetzung durch Beta-Blocker, jedoch nur eine inkomplette durch Adrenalektomie. Dies spricht für eine nervale Beteiligung in der Anfangsphase. Interessanterweise läuft die Stimulierung über zentralnervöse Zentren, die für die Regulationsvorgänge im Stress immer mehr in den Vordergrund der Diskussion rückt, im Falle des Glukagons tatsächlich von Hypothalamus über nervale Bahnen, während die Insulinfreisetzung unter rein adrenaler Kontrolle steht (Frohman u. Bernardis, 1971).

Nun gibt das Verhalten von Noradrenalin- und Adrenalinplasmaspiegel im Vergleich zueinander Hinweise über nervale bzw. adrenale Anteile (Käser, 1966), auch wenn aus den Nervenendigungen ausgeschüttetes Noradrenalin nur zu ca. 5 % ins Blut gelangt (Holtz u. Palm, 1966) und im Nebennierenmark neben Adrenalin auch Noradrenalin produziert wird. Während Jäättelä, 1972, und Hanquet et al., 1970, einen langsameren Abfall der erhöhten Noradrenalin-Spiegel als der Adrenalinspiegel fanden, und Hanquet et al. 1970 deswegen als Ursache des differenten Verhaltens der Katecholamine eine unterschiedliche Katabolisierungsrate beider Hormone durch schockbedingte Leberfunktionsstörung erwägten, sah Young und Gray 1956 bei Ratten unter standardisiertem Trauma frühere NA-Abfälle. In unserer Studie war der Abfall in etwa parallel, eine unterschiedliche Eliminierungsrate als Ursache der differenten Kinetik erscheint somit unwahrscheinlich.

So gewinnt die differente Kinetik der beiden Hormone in der Frühphase der Stresseinwirkung an Aussagekraft für die Beurteilung der Beteiligung nervaler bzw. adrenaler Faktoren an der Glukagonfreisetzung. Wie andere Autoren bei verschiedenen Stressformen (Young u. Gray, 1956; Hanquet et al., 1970; Wilmore et

al., 1974; Laves u. Berg, 1965; Palm u. Appel, 1976), fanden wir einen schnelleren Noradrenalinanstieg, die Spiegel waren am Unfallort bereits maximal erhöht, während die Adrenalinspiegel bis zur ersten Stunde noch deutlich anstiegen; die Glukagonspiegel hatten ebenfalls bereits am Unfallort ein Plateau erreicht, das über die nächsten sieben Stunden nur leicht steigende Tendenz zeigte. Dies stimmt überein mit sofortiger maximaler Glukagonfreisetzung auf Schmerz und psychischen Stress (Bloom et al., 1973a,b,c) und spricht für den überwiegend nervalen Charakter der Regulation in der Anfangsphase.
Eine ähnliche Kinetik könnte jedoch theoretisch auch auf einer maximalen Stimulierbarkeit durch Katecholamine unter den gegebenen Bedingungen beruhen, wobei dieses Maximum eben schon bei niedrigeren Katecholaminspiegeln erreicht war.

4.2.6 Glukocorticoide

Glukocorticoide führen zu einer Erhöhung der basalen und aminogenen Glukagonfreisetzung (Marco et al., 1973), allerdings offenbar nur indirekt (Wise et al., 1973). Im Polytrauma werden erhöhte Cortisonspiegel gemessen (Kastin et al., 1974; Gobiet et al., 1976), die mit erhöhter Freisetzung aus der Nebennierenrinde unter ACTH-Wirkung (Estep et al., 1963) und vermindertem Abbau in der Leber erklärt werden (Brown et al., 1954; Steenburg u. Ganoug, 1955; Yalow et al., 1969).
Da die Erhöhung der Glukocorticoidspiegel in eine spätere Phase reicht als die der Katecholamine und von diesen offensichtlich unabhängig ist, wie unsere Studie übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren (Kehlet et al., 1974; Morris et al., 1973) zeigt, lenkt der Vergleich mit Glukagonspiegelanstiegen das Augenmerk auf den Zusammenhang beider Hormone.
Wie aus Abb.28d zu sehen ist, beginnt 24 h nach dem Trauma schon der Cortisolspiegel zu fallen, während hier das Glukagon ein Maximum erreicht. Eine Korrelation beider Hormone scheidet damit aus. Auch indirekte Faktoren wie Aminosäurespiegel und freie Fettsäuren scheinen, wie vorher erläutert, keine Bedeutung zu haben im Sinne einer cortisolvermittelten Stimulation von Glukagon.

4.2.7 Hämokonzentration und -dilution

Bei tierexperimentellem hämorrhagischen Schock erwägte Lindsey et al., 1975, die Möglichkeit der Hämokonzentration als Ursache für die gefundene Hyperglukagonämie. Diesen Faktor können wir aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausschließen:

1. Durch die frühzeitige Volumensubstitution wurde in unserer Studie bei bestehendem Blutverlust schneller eine Hämodilution erreicht, wie der Verlauf von Hb, Hk und Gesamteiweiß zeigt; trotzdem kommt es zur Erhöhung der Glukagonspiegel.
2. Die Hyperglukagonämie besteht fort über die Phase des Volumenmangelschocks, dessen Ende durch den Abfall der Katecholamine markiert wird (Hardaway, 1968; Jäättelä, 1972).

4.2.8 Minderperfusion Glukagon-eliminierender Organe

Im Rahmen des Volumenmangelschocks kommt es zu einer Minderperfusion verschiedener Organe und konsekutiver O_2-Mangelversorgung, die an einzelnen Organen bereits bei noch normalem Blutdruck beginnt, wie Sinagowitz et al. 1974 zeigte. Am frühesten betroffen sind nach diesen Untersuchungen Skelettmuskulatur, Leber und Pankreas. Die Nierenminderperfusion beginnt bei einem arteriellen Druck von unter 80 mm Hg (R. Commichau, 1973).
Nun sind Leber, Muskulatur und Niere Glukagon-eliminierende Organe, deren Minderperfusion einen Anstieg des Glukagons im Blut bedingen könnte.
In der Leber wird jeweils 1/3 des Glukagons und Insulins abgebaut (Brockman et al., 1976 u. 1974), eventuell durch dasselbe Enzym (Duckworth u. Kitabachi, 1974; Kenny, 1956; Narahara u. Williams, 1957). Die Ausscheidung mit der Galle ist von geringer Bedeutung (Assan, 1972).
In der Muskulatur fand Duckworth et al. 1975 ein Abbauenzym, das auch Insulin zum Substrat hat.
Auch in der Niere erfolgt die Glukagonelimination enzymatisch (Duckworth, 1976a,b), die Urinclearance hingegen ist nur zu 5 % beteiligt (Narahara, 1958; Lefebvre et al., 1974). Obwohl auch hier die Muskelprotease, die auch Insulin abbaut, isoliert werden konnte (Duckworth, 1976b), scheint die neutrale Protease des

Bürstensaums, die Insulin nicht abbaut, von höherer Bedeutung zu sein (Duckworth 1976b), ebenfalls stellte Lefebvre und Luyckx 1976 die Unabhängigkeit der Glukagon- und Insulin-Elimination durch die Niere fest.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint die Minderperfusion der Glukagon-eliminierenden Organe für die Hyperglukagonämie im Polytrauma unwahrscheinlich:

1. dauert die Hyperglukagonämie weit über den Zustand der Hypovolämie und Status der Organminderperfusion hinaus;
2. steigen die Spiegel gerade zum Zeitpunkt der Beseitigung des Volumenmangels, wie sie durch Normalisierung von pH, Base Excess und Standardbikarbonat sowie den Abfall der Katecholamine angezeigt wird, zu noch höheren Werten an;
3. a) die Wirkung einer Muskel- und Leberminderperfusion müßte aufgrund des identischen Abbaumechanismus in diesen Organen zu einem begleitenden Insulinanstieg führen. Dies ist gerade in dieser Phase nicht der Fall.
   b) Gegen die Bedeutung der Nierenminderperfusion sprechen die normalen Nierenfunktionswerte im Blut sowie die nachgewiesene Hyperglukagonämie bei leicht Polytraumatisierten, wo sicher keine Hypoxie des Nierengewebes vorliegt.

Allerdings mag die Minderperfusion der eliminierenden Organe die Hyperglukagonämie erst ermöglichen im Zustand der Hypovolämie, wo das Glukagon-freisetzende Pankreas ebenfalls von dieser Situation betroffen ist.
Der Anstieg der Glukagonwerte nach Beseitigung des Volumenmangels spricht für den limitierenden Faktor der Pankreasminderperfusion bei maximaler Stimulation der Glukagonfreisetzung.

4.2.9 Die Rolle von Schock, Schmerz und Trauma Versuch einer Aufschlüsselung der Stressfaktoren

Wie Lindsey et al., 1974b und 1975, an Hunden gezeigt hat, führt die Exsangination auch ohne Trauma zu Glukagonanstiegen. Die Hyperglukagonämie im cardiogenen Schock ist höher als bei Myokardinfarkten ohne Schock. Der Schock wirkt somit bei vorliegendem Trauma als zusätzlicher Faktor.

Während jedoch im hämorrhagischen Schock die Hyperglukagonämie erst nach 10-20 min beginnt (Lindsey et al., 1974b u.1975), hatte sie bei den Polytraumatisierten unserer Studie schon am Unfallort, also ca. 15 min nach dem Trauma, ein Plateau erreicht und prägte sich weiter aus zu einem Zeitpunkt, wo der Volumenmangelschock beseitigt wurde.
Nun ist Schmerz ein Stressfaktor, der zu einer sofortigen Glukagonerhöhung führt (Bloom, 1973a). In unserer Studie wurden jedoch frühzeitig Analgetika intravenös verabreicht, so daß dieser Faktor allenfalls für die Hyperglukagonämie am Unfallort mitverantwortlich gemacht werden kann.
Für die Beurteilung des Stressfaktors Trauma wurden operative Eingriffe herangezogen. Während Lindsey et al. 1974a u.b und Giddings et al. 1975 keine signifikante Glukagonerhöhung nachweisen konnten, fand Russel et al. 1975 eine signifikante Hyperglukagonämie, postoperativ jedoch lag bei allen Untersuchungen eine Hyperglukagonämie vor: Diese hielt über den Untersuchungszeitraum von 5 Tagen post operationem an und war unabhängig von Glukosezufuhr (Giddings et al., 1974 u.1975). Interessanterweise wurde im Myokardinfarkt ohne Schock im Gegensatz zum cardiogenen Schock bei Infarkt und im Gegensatz zur Pektangina ohne Infarkt ebenfalls eine direkte Beziehung der Glukagonwerte zu den Glukosespiegeln vermißt (Willerson et al., 1974). Dies stimmt überein mit unseren Befunden an Polytraumatisierten und weist auf die Rolle des Traumas per se als Teilursache der gefundenen Hyperglukagonämie hin.

4.3 Glukagonwirkung - Beziehungen zu Effektoren des Glukagons

4.3.1 Glukose

Die vorliegende Hyperglykämie im Polytrauma ist seit 1977 bekannt. Inwieweit das Glukose freisetzende Glukagon hierfür verantwortlich ist, konnte bislang nicht geklärt werden, da ein Vergleich der beiden Parameter im Verlauf des Geschehens nicht vorlag. Lediglich Meguid et al. erwähnten 1972, daß das Maximum der Glukosewerte dem der Glukagonwerte um 12 h vorausginge. Tatsächlich zeigt unsere Studie nach 3 h das Glukosemaximum und das

Glukagonmaximum nach 24 h. Eine positive Korrelation beider Parameter besteht nicht. Auch nicht bei Berücksichtigung des Insulinspiegels: Der Glukagon/Insulin Quotient $\frac{G}{I}$ fällt von anfangs maximalen Werten innerhalb der ersten 3 h ab und pendelt sich dann im weiteren Verlauf auf ein Niveau ein. Dies spricht gegen den unmittelbaren Einfluß von Glukagon auf den Verlauf des Glukosespiegels, ein Befund, der mit dem Faktor Trauma zusammenzuhängen scheint, wie Willerson et al., 1974, zeigte durch die Differenzierung von reinem Myocardinfarkt, cardiogenem Schock und Pektangina (s.u. II.4.2.1).
Eine Insulinsekretionsstarre mit Werten im Normbereich trotz Hyperglukagonämie und Hyperglykämie, wie Giddings sie 1974 (b) für das Polytrauma und Unger et al. 1970 sowie Willerson et al. 1974 für den Myocardinfarkt beschrieben, mag die Hyperglykämie ermöglichen. Wie der Vergleich mit der $\frac{G}{I}$ -Relation unserer Studie zeigt, ist sie jedoch auch nicht verlaufsbestimmend.
Hierfür kommen am ehesten die Katecholamine in Betracht, wie der Vergleich von Abb.27a und Abb.28c und eine statistisch signifikante Korrelation anzeigt. Dies stimmt überein mit dem Befund von Halmagyi et al.1967, der einen Abfall der Glukosespiegel nach Denervierung des NNM beobachtete. Glukagon bildet die Vorbedingung für die Katecholamin-bedingte Hyperglykämie (Gerich et al., 1976).

4.3.2 Lipide

Glukagon bewirkt eine Senkung von Cholesterin- und Neutralfettspiegeln im Plasma (Caren u. Corbo, 1960). Inwieweit der von uns gefundene Abfall von Triglyceriden und Cholesterin glukagonbedingt ist, läßt sich wegen der unvollständig aufgeklärten Wechselbeziehungen nicht sagen.

4.3.3 Proteine

Wie oben schon beschrieben, ist der Abfall von Gesamteiweiß und Albumin im Blut ein Dilutionseffekt, der spätere Anstieg ein Therapieeffekt, wobei das Nachhinken des Albumins den vorliegenden Katabilismus andeutet (Davies, 1970). Wegen der Überschneidungen

der Effekte und des indirekten Charakters der Parameter ist eine Aussage über die Rolle von Glukagon hierbei nicht möglich, wenn auch bei der vorliegenden Insulin/Glukagon-Relation eine gesteigerte Glukogeneserate zu fordern wäre (Unger et al., 1971).

4.3.4 Kalium

Glukagon bewirkt einen Anstieg des K-Spiegels, Insulin einen Abfall, der homöostatisch relevant ist (Luderitz et al., 1971; Santeusiano et al., 1973).
Nun fand sich in unserer Studie ein initialer Kaliumabfall trotz Hyperglukagonämie bei normalem Insulin und trotz Azidose und traumatischer Zellschädigung. Die Wirkung des Glukagons wurde hier offenbar durch einen Hyperaldosteronismus überspielt, der durch stressbedingte ACTH-Freisetzung und das Renin-Angiotensin-System bewirkt wird (Llaurado u. Woodruff, 1957). Evtl. ist der Abfall zur 1. Stunde auch dilutionsbedingt. Der relativ rasche Anstieg zu Normalwerten bei weiterhin bestehender ACTH-Stimulation der NNR, wie sie durch die gemessenen Cortisolspiegel (Abb.29d) angezeigt wird, läßt bei inzwischen normalisierten pH-Werten und Beseitigung des Volumenmangels an eine Glukagonwirkung denken.

4.3.5 Insulin

Glukagon wirkt insulinotrop (Samols et al., 1966). Trotz der vorliegenden Hyperglukagonämie und Hyperglykämie befand sich Insulin in unserer Studie, wie auch bei anderen Untersuchern (Lindsey, 1974; Meguid, 1972,1973) im Normbereich bzw. nicht signifikant erhöht. Da diese Insulinsekretionsstarre refraktär gegenüber Tolbutamid ist und eine Hypotension zur Bedingung hat, vermutete Unger et al. 1970 eine Pankreasminderperfusion als Ursache. Im Hinblick auf die Hyperglukagonämie wird jedoch bei der ähnlichen Pharmakokinetik beider Hormone (s.o.) eine Begrenzung dieser Art unwahrscheinlich. Die verminderte Antwort auf die Sekretagoga läßt sich auch hinreichend erklären durch die bestehende Stimulierung des adrenergen Systems, die ja zu einer vermehrten Glukagonfreisetzung, jedoch zu einer Hemmung von Glukose-Glukagon- und Tolbutamid-induzierter Insulinsekretion führt (Gerich et al.,

1976). Für diese These spricht der entgegengerichtete Verlauf von Insulin und Katecholaminspiegeln.

4.4 Hyperglukagonämie im Trauma - Nutzen oder Schaden?

4.4.1 Stoffwechsel

Glukagon fördert bei dem gegebenen $\frac{I}{G}$ Verhältnis die Lipolyse und bewirkt eine Kaliumerhöhung. Beide Faktoren begünstigen eine Azidose. Als der Faktor, der die katecholaminbedingte Hyperglykämie ermöglicht, erscheint uns jedoch - zumindest in der Volumenmangelsituation - trotzdem das niedrige $\frac{I}{G}$ Verhältnis sinnvoll für die Erhaltung des Stoffwechsels von Hirn und Erythrozyten. Deren Stoffwechsel ist, im Gegensatz zu anderen Organen, vom Insulin unabhängig (Förster, 1975). Die durch Glykogenolyse bereitgestellte Glukose steht somit diesen Organen in vollem Umfang zur Verfügung. Insulinabhängige Organe werden vom Glukoseverbrauch weitgehend abgeschlossen. So steht der begrenzte Vorrat an Glykogen in der minderperfundierten Leber vornehmlich diesen vital wichtigen Zellen zur Verfügung. Außerdem kommt es unter Glukagongaben zu einem Abfall des Laktat-Blutspiegels aus metabolischen Gründen, evtl. auch wegen einer Verbesserung der Leberperfusion (Schumer et al., 1973; Lindberg, 1977).
Allerdings bedingt das fixierte $\frac{I}{G}$ Verhältnis die Gefahr einer Hyperosmolarität bei Zufuhr von zusätzlicher Glukose.

4.4.2 Hämodynamik

Glukagon wirkt positiv inotrop, chronotrop und "coronardilatatorisch" (Farah u. Tuttle, 1960; Lucchesi, 1968; Glick et al., 1968; Linhardt et al., 1968) auch in der Hypovolämie (Pinardi et al., 1975). Der periphere Gefäßwiderstand wird erniedrigt im normovolämischen (Linhardt et al., 1968) und hypovolämischen Zustand (Pinardi, 1975; Hempelmann et al., 1974) bei gleichbleibendem (Pinardi) oder sogar erhöhtem (Hempelmann et al., 1974) Blutdruck.
Gefördert wird insbesondere auch die Durchblutung des Splanchnikus (Kock et al., 1970; Shoemaker u. van Itallie, 1960) und der

Niere (Levy, 1975). Da die adäquate Sauerstoffversorgung der Leber im Schock lebenswichtig ist (Frank et al., 1946), der hepatische Sauerstoffverbrauch jedoch trotz verminderter Perfusion gleichbleibt (Bearn et al., 1951; Gilmore, 1958; Ballinger u. Vollenweider, 1960) oder sogar ansteigt (Shoemaker et al., 1973), erscheint der Effekt des Glukagons hier von Vorteil zu sein.

Levy und Starr haben 1972 gezeigt, daß Glukagon ein potenter renaler Vasodilatator ist und eine starke Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate bewirkt, an der ischämischen Niere wird dieser Effekt noch erheblich verstärkt und kommt der Wirkung einer hypertonen Mannitollösung gleich (Levy, 1975). Wenn diese Wirkungen auch in unphysiologisch hohen Dosen erreicht wurden, so erscheint eine Blockierung des Glukagons z.B. durch Somatostatin unter diesem Aspekt nicht anzustreben zu sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

I. Verbesserung des Glukagon-RIA

Die Radiojodierung von Glukagon unter Verwendung von Chloramin-T wurde hinsichtlich der Abhängigkeit von Reaktantenkonzentration, Reaktionsdauer und pH-Wert untersucht und optimiert.

Den Methoden anderer Autoren zur Reinigung von markiertem Glukagon wurde das erheblich schnellere und unkomplizierte batch-Verfahren mit Quso G 32 gegenübergestellt. Die hohe Qualität des so gewonnenen ^{125}J-Glukagons erwies sich in einer 98 - 99%igen Fällbarkeit durch Protein fällende Reagenzien, einer Adsorption an Holzkohle von 98 %, Antikörper-Bindung von 99 % und immunologisch gleichem Verhalten von radioaktivem und normalem Glukagon. Der Vergleich mit ^{125}J-Glukagon von Jørgensen u. Larsen, das mit QAE Sephadex A 25-Säulenchromatographie gereinigt worden ist, ergab identische Ergebnisse.

Zur Verbesserung der Immunogenität des schwachen Antigens Glukagon haben wir verschiedene Immunogenpräparationen hergestellt und miteinander verglichen. Hierbei ergab eine Präparation (Glukagon-Polymerisation mit Carbodiimid in Guanidin HCl-Lösung) Antikörper hervorragender Qualität: Ein Antikörper zeigte eine Sensitivität, die die Bestimmung von Plasmaglukagonspiegeln ermöglichte (kleinste bestimmbare Menge ca. 10 pg), Homogenität des Ak (Linearität im Scatchard-plot), hohe Affinität (Gleichgewichtskonstante K = 4.0 ng^{-1}), einzigartig hohe Avidität (minimale Inkubationszeit von ca. 6 h).

Unter den vielen beschriebenen Anti-Glukagon-Seren waren nur einzelne sogenannte spezifische Anti-Glukagon-Sera, die keine Kreuzreaktivität mit Enteroglukagon, Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP), Sekretin und Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) zeigten. Mit dem von uns präparierten Glukagon-Polymer haben wir erstmals ein Immunogen gefunden, das ausschließlich sogenannte spezifische Anti-Glukagon-Sera hervorbrachte.

Der Einfluß der Albumin-Konzentration und der Holzkohlenmenge auf die Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem Glukagon mit

Dextran beschichteter Holzkohle wurde untersucht.
Albumin verhindert 1. die unspezifische Adsorption von AgAk-Komplexen an Holzkohle und bindet 2. "geschädigtes" ^{125}J-Glukagon.
Das zuletzt genannte Phänomen wurde von uns erstmals gezeigt.
Eine Optimierung der Bedingungen konnte erreicht werden.

II. Glukagon im Polytrauma

Der frühzeitige Untersuchungsbeginn, die Beobachtung des Verlaufs, die zeitliche Korrelation einer Vielzahl anderer Parameter sowie der schnelle Einsatz von schockbekämpfenden Maßnahmen haben neue Erkenntnisse über Glukagon im Polytrauma ermöglicht.

Wir fanden im gesamten Untersuchungszeitraum (15 min - 5 Tage) eine Hyperglukagonämie. Bis zur 7. h waren die Glukagonspiegel annähernd konstant, um ca. 270 % der Norm erhöht, nach 12 h stiegen sie weiter an zu einem Maximum bei 24 bzw. 36 h (460 % der Norm) und lagen nach 5 Tagen immer noch 300 % über dem Normalwert.

Die Untersuchung der Glukagonmodulatoren ergab:

Zu den Glukosespiegeln bestand keine Korrelation - die Glukagon-Regulation scheint bei Polytraumatisierten von dem Modulator Glukose abgekoppelt.
Unter den potentiellen Stimulatoren der Glukagonfreisetzung konnten Aminosäuren, Triglyceride, Kalium und Calcium als Ursache der Hyperglukagonämie weitgehend ausgeschlossen werden.
Die stimulierende Wirkung des sympathikoadrenergen Systems auf die Glukagonfreisetzung konnte durch den Vergleich der Kinetik von Noradrenalin und Adrenalin in nervale und adrenerge Komponente differenziert werden.
Da sowohl Glukagon- wie Noradrenalin-Spiegel schon am Unfallort ein Plateau erreicht hatten, die Adrenalinspiegel jedoch erst im Anstieg begriffen waren, ist die Bedeutung der nervalen Komponente in der Anfangsphase des Polytraumas belegt.
Für die Glukokortikoide fand sich kein Anhalt einer Beeinflussung des Glukagonspiegels.
Eine Hämokonzentration konnte als Ursache der Hyperglukagonämie ausgeschlossen werden.

Die Minderperfusion der Glukagon-abbauenden Organe Leber, Muskulatur und Niere hat allenfalls permissiven Charakter für eine Hyperglukagonämie bei minderperfundiertem Pankreas. Dies zeigen 1. der normale Spiegel des Insulins in dieser Phase - Insulin wird in denselben Organen freigesetzt bzw. eliminiert -, 2. der weitergehende Anstieg des Glukagonspiegels unter Beseitigung des Volumenmangelschocks, 3. die normalen Nierenfunktionswerte im untersuchten Patientengut.
Wir haben den Versuch der Aufschlüsselung der Stressfaktoren des Polytraumas Schock, Schmerz, Trauma vorgenommen.
Die schon am Unfallort festgestellte Hyperglukagonämie ermöglichte die Postulation zusätzlicher Stimulatoren neben dem Volumenmangelschock, da experimentelle Untersuchungen anderer Autoren einen langsameren Glukagonanstieg bei Volumenmangel als alleiniger Schockursache ergaben. In erster Linie kommt hierfür der Schmerz in Betracht. Für die Bedeutung des Traumas per se spricht die Abkoppelung vom Glukagonmodulator Glukose, wie wir sie für das Polytrauma fanden und andere Autoren für den Herzinfarkt im Gegensatz zu Pektangina und cardiogenem Schock.

Die Untersuchung der Glukagoneffektoren ergab:

Für die Hyperglykämie im Polytrauma kommt Glukagon nicht in erster Linie in Betracht, wie die fehlende Korrelation der Verläufe zeigt, sondern vielmehr die Katecholamine, für deren Wirkung jedoch Glukagon Voraussetzung ist.
Die "Insulinstarre" im Polytrauma ist damit erklärbar, daß sich die Stimulation durch Hyperglykämie und Hyperglukagonämie einerseits sowie Katecholamin-bedingter Hemmung andererseits die Waage halten.

Trotz Begünstigung einer Ketoazidose halten wir die Hyperglukagonämie im Polytrauma für nützlich, da durch Glukagon 1. die vitalen insulinunabhängigen Organe Hirn und Erythrozyten bei der bestehenden Insulinstarre über die Glukagon-Katecholamin-Achse mit Glukose versorgt werden, 2. die Laktat-Spiegel gesenkt werden, das Herzminutenvolumen erhöht, der periphere Gefäßwiderstand erniedrigt und die Leber-, Nieren- und Lungendurchblutung gefördert wird.

Herrn Professor Dr. W. MAURER und Herrn Professor Dr. A.M. KELLERER danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut der Medizinischen Strahlenkunde.

Herrn Professor Dr.Dr. K. HEMPEL gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Anleitung zu experimentellem Arbeiten sowie die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Diskussion der vorliegenden Untersuchungen.

Herrn Dr. SCHMID danke ich für die Einführung in die Methodik des Radioimmunoassays und Herrn Dr. SEFRIN für die Überlassung von Blutplasmaproben zur Glukagonbestimmung sowie von Teilergebnissen aus seiner Studie an Polytraumatisierten.

Bei Frau Christa EICHLER und Frau Gerda DUSEL möchte ich mich für die technische Assistenz bedanken.

Der Firma Eli Lilly, Indianapolis, verdanke ich die großzügige Bereitstellung von 20 mg hochgereinigtem Glukagon.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AQUILAR-PARADA,E., A.M.EISENTRAUT, R.H.UNGER
Effects of starvation on plasma pancreatic glucagon in normal man.
Diabetes 18 (1969), 717-23

2. ASSAN, R.
In vivo metabolism of glucagon.
In: Glucagon molecular physiology, clinical and therapeutic implications.
Ed.P.Lefebvre and R.H. Unger, Pergamon Press, Oxford (1972), 47-59

3. ASSAN, R., G.ROSSELIN, J.DRONET, J.DOLAIS, G.TCHOBRONTSKY
Glucagon Antibodies.
The Lancet 2 (1965), 590

4. ASSAN,R., G.ROSSELIN u. J.DOLAIS
Effets sur la glucagonemie des perfusions et ingestions d'acide amines.
In: Journees annuelles de Diabetologie de l'Hotel-Dieu; Ed. Medicales Flammarion (1967), 25

5. ASSAN,R. and N.SLUSHER
Structure/ function and structure/ immunoreactivity relationships of the glucagon molecule and related synthetic peptides.
Diabetes 21 (1972), 843-855

6. AUBERT,M.L. and Th.LEMARCHAND-BERAUD
Specifity: Interference by substances unrelated to the antigen.
In: Radioimmunoassay methods, Ed. K.E.Kirkham u. W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 215-239

7. BALLINGER,W.F. and H.VOLLENWEIDER
The effect of acute hemorrhage upon hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption in dogs.
Surgery 48 (1960), 758

8. BATHENA,S.J., P.V.PERRINO, N.R.VOYLES, S.S.SMITH, S.D.WILKINS, D.H.COY, A.V.SCHALLY and L.RECAUT
Reversal of somatostatin inhibition of insulin and glucagon secretion.
Diabetes 25 (1976), 1031

9. BAUER,B.L. und K.SCHULTIS
Posttraumatische Katabolie und parenterale Ernähung - Der Eiweißstoffwechsel.
Aktuell.Chir. 5 (1966), 281

10. BEARN,A.G., B.BILLING, O.G.EDHOLM and S.SHERLOCK
Hepatic blood flow and carbohydrates changes in man during fainting.
J.Physiol. 115 (1951), 442

11. BERNARD,C.
Leçons sur le diabete et la glycogenese animale.
Paris, Bailliere (1877), 210

12. BERNAUER,W.M., M.HAGEDORN, P.FILIPOWSKI
Catecholamine release during anaphylactic shock in guinea pigs.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 270 (1971), 326

13. BERSON,S.A. and R.S.YALOW
Recent studies on insulin-binding antibodies.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 82 (1959a), 388

14. BERSON,S.A. and R.S.YALOW
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J.Clin.Invest. 38 (1959b), 1996

15. BERSON,S.A. and R.S.YALOW
Immunoassay of protein hormones.
In: The Hormones, Vol.IV, Ed. G.Pincus, K.V.Thincann und E.B.Astwood, N.Y., Academic Press (1964), 557

16. BERSON,S.A. und R.S.YALOW
General principles of radioimmunoassay.
Clin.chim.Acta 22 (1968), 51

17. BIRKE,G., S.O.LILJEDAHL, L.O.PLANTIN, J.WETTERFORS
Albumin catabolism in burns and following surgical procedures.
Act.chir.scand. 118 (1960), 353

18. BIRKE,G., L.A.CARLSON, S.O.LILJEDAHL
Lipid metabolism and trauma.
Acta med.scand. 173 (1963), 25

19. BLOOM,S.R.
Glucagon, a stress hormone.
Postgraduate Medical Journal 49, Aug.Suppl. (1973a), 607

20. BLOOM,S.R., P.M.DANIEL, D.J.JOHNSTON, O.OGAWA and O.E.PRATT
Release of glucagon induced by stress.
Quarterly Journal of Experimental hysiology 58 (1973b), 99

21. BLOOM,S.R., A.V.EDWARDS, N.J.A.VAUGHAN
The role of the sympathetic innervation in the control of plasma glucagon concentration in the calf.
J.Physiol. London 233 (1973c), 457

22. BÖTTGER,I.E., M.SCHLEIN, G.R.FALOUNA, J.P.KNOCHEL and R.H. UNGER
The effect of exercise on glucagon secretion.
J.Clin.Endocrinol. Metab. 35 (1972), 117-125

23. BROCKMAN,R.P., and E.N.BERGMAN
Quantitative aspects of insulin secretion and its hepatic and renal removal in sheep.
Ann.J.Physiol. 229 (1975), 1627

24. BROCKMAN,R.P., J.G.MANNS and E.N.BERGMAN
Quantitative aspects of secretion and hepatic removal of glucagon in sheep.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 54 (1976), 666

25. BROMER,W.W., L.G.SINN and K.O.BEHRENS
The amino acid sequence of glucagon. V. Location of amide groups, acid degradation studies and summary of sequential evidence.
J. Amer. Chem. Soc. 79 (1957), 2807

26. BROWN,H., D.G.WILLARDSON, L.T.SAMMELS, F.H.TYLER
17. Hydroxycorticosteroid metabolism in liver disease.
J.clin.Invest. 33 (1954), 1524

27. BUCHANAN,K.D., A.M.Mc CARROLL
Comparison of methods of separation from bound hormone in the radioimmunoassay of insulin and glucagon.
In: Radioimmunoassay Methods, Ed. K.G.Kirkham and W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 266-272

28. BUCHANAN,K.D., S.S.SOLOMON, J.E.VANCE, H.P.PORTER, R.H. WILLIAMS
Glucagon clearance by the isolated perfused rat liver.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128 (1968), 620

29. BURKARDT,K.
Untersuchungen zur Pathogenese der Fettembolie.
Med.Welt 21 (1970), 1969

30. CANNON,W.B.
Bodily changes in poni hunger, fear and rage.
Appleton, New York (1915)

31. CAREN,R. and L.CORBO
Metabolism 9 (1960), 938

32. CAREY,L.C., C.T.BLOUTIER, B.D.LAWERY
Blood sugar and insulin response in humans in shock.
Ann.surg. 172 (1970), 342

33. CARLSON,L.A. and WADSTRÖM
Clin.Chem. 4 (1959), 197

34. CHARD,T.
Observations on the use of a mathematical model in radioimmunoassay.
In: Radioimmunoassay Methods, Ed. K.E.Kirkham and W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 595-598

35. CHARD,T., M.MARTIN, J.LANDON
The separation of antibody bound from free peptides using amonium sulphate and ethanol.
In: Radioimmunoassay Methods, Ed. K.E.Kirkham and W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 257-266

36. CHASSON et al.
Amer.J.Clin.Path. 35 (1961), 83

37. CHESNEY,T. and J.G.SCHOFIELD
Studies on the secretion of pancreatic glucagon.
Diabetes 18 (1969), 627

38. COMMICHAU,R.
Niere im Schock und Schockniere.
Internist.prax. 13 (1973), 597

39. CUATRECASAS,O. and G.ILLIANO
Production of anti-glucagon antibodies in poly-L-lysine "responder" guinea pigs.
Nature New Biol. 230 (1971), 60-61

40. CUTHBERTSON,D.P.
Post shock metabolic response.
Lancet 1, 1942, 433

41. DAUGHADAY,W.H. and L.S.JACOBS
Methods of separating antibody-bound from free antigen.
In: Principles of Competitive Protein-Bindung Assays, Eds. W.D.Odell and W.H.Daughaday, Lippincott, Philadelphia (1971), 303-324

42. DAVIES,J.W.L.
Protein metabolism following injury.
J.clin.Pathol.23; Suppl.(Coll.Path.) 4 (1970), 56

43. DAY,E.D.
Foundations of Immunochemistry.
Williams and Wilkins, Baltimore (1966)

44. DAY,L.A., J.M.STURTEVANT and S.J.SINGER
Ann.N.Y. Acad.Sci. 103 (1963), 611

45. DOBBS,R., H.SAKURAI, H.SASAKI, G.FALOONA, I.VALVERDE, D.BAETENS, L.ORCI and R.H.UNGER
Glucagon: role in the hyperglycemia of diabetes mellitus.
Science 187 (1975), 544-547

46. DRUCKER,W.R., S.N.M.VIGAS, F.C.BAUER, R.E.HAIST
Tolerance to prolonged hypovolemic shock: the effect of infusion of an energy substrate.
Brit.J.Surg. 56 (1969), 704

47. DUCKWORTH,W.C.
Insulin and glucagon degradation by the kidney. I. Subcellular distribution under different assay conditions.
Biochim.Biophys.Acta 437 (1976a), 518

48. DUCKWORTH,W.C.
Insulin and glucagon degradation by the kidney. II. Characterization of the mechanisms at neutral pH.
Biochim.Biophys.Acta 437 (1976b), 531

49. DUCKWORTH,W.C., and KITABACHI,A.E.
Insulin and glucagon degradation by the same enzyme.
Diabetes, 23 (1974), 536

50. DUCKWORTH,W.C., M.HEINEMANN and E.A.KITABACHI
Proteolytic degradation of insulin and glucagon.
Biochim.Biophys.Acta 337 (2) (1975), 421

51. EDWARDS,J.C., S.L.HOWELL, K.W.TAYLOR
Radioimmunoassay of glucagon released from isolated guinea-pig islets of Langerhans incubated in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 215 (1970a), 297

52. EDWARDS,J.C., K.W.TAYLOR
Fatty acids and the release of glucagon from isolated guinea-pig islets of Langerhans incubated in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 215 (1970b), 310

53. EISEN,H.N. und G.W.SISKIND
Variations in affinities of Antibodies during the immune response.
Biochemistry 3 (1964), 996

54. EISENTRAUT,A.M., A.OHNEDA, E.PARADA and R.H.UNGER
Immunological discrimination between pancreatic and enteric glucagon-like immunoreactivity (GLI) in tissues and plasma.
Diabetes 17 (1968), 321-322

55. EISENTRAUT,A.M., N.WHISSEN, R.H.UNGER
Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with trasylol.
American Journal of Medical Science 225 (1968), 137

56. EKINS,R.P., G.B.NEWMAN and J.L.H. O'RIORDAN
In: Hayes, R.L., F.A. Goswitz and B.E.P. Murphy, Radioisotopes in medicine: In vitro studies,
US Atomic Energy Commission, Oak Ridge (1968), 59

57. EKINS,R.P. and G.B.NEWMAN
In: Margoulies,M., Protein and polypeptide hormones, Excerpta Med., Int.Congr.Series, 161, Amsterdam (1969), 329 und 575

58. EKINS,R.P. and G.B.NEWMAN
In: Diczfalusy,E., Steroid assay by protein binding 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Geneva (1970a), 11

59. EKINS,R.P., G.B.NEWMAN and J.L.H.O'RIORDAN
In: Mc Arthur,J.W. and T.Colton, Statistics in endocrinology, MIT Press Cambridge (1970b), 345

60. ESTEP,H.L., D.P.ISLAND, R.L.NEY, G.D.LIDDLE
Pituitary-adrenal dynamics during surgical stress.
J.Clin.Endocrin. 23 (1963), 419

61. ESTERHUIZEN,A.C., and S.L.HOWELL
Ultrastructure of the A cells of cat islets of Langerhans following sympathetic stimulation of glucagon secretion.
Journal of Cell Biology 46 (1970), 593

62. EUERBÄCK,L., P.M.LUNDIN, J.MELLGREN
Influence of stress and endocrine factors on plasma proteins in the rat.
Act.endocrinol. 32 (1959), 552

63. FALOONA,G.
The structure-function relationships of pancreatic glucagon.
In: Lefebvre and Unger, Glucagon, molecular physiology, clinical and therapeutic implications, Pergamon Press, Oxford (1972), 201-204

64. FALOONA,G., and R.H.UNGER
Glucagon.
In: Methods of Hormone Radioimmunoassay, Ed. Jaffe,B.M., and Behrman,H.R., Academic Press, New York and London (1974), 317-330

65. FARAH,A., and R.TUTTLE
Studies on the pharmacology of glucagon.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 120 (1960), 49

66. FELDMAN,H., and D.RODBARD
Mathematical theory of radioimmunoassay.
In: Odell,W.D., und W.H.Daughaday, Principles ov Competitive Protein-Binding Assays,
J.B.Lippincott Company, Philadelphia (1971), 158-203

67. FELIG,P., J.WAHREN, R.HENDLER and G.AHLBORG
Plasma glucagon levels in exercising man.
New Engl.J.Med. 287 (1972), 184-185

68. FOA,P.P.
The secretion of glucagon.
In: Handbook Physiol.Endocrinology Sec 7, Vol.I,
Ed. R.O.Greep, E.B.Ashwood, Washington DC:
Am.Physiol.Soc. (1972), 261-78

69. FÖRSTER,H.
Zum Stoffwechsel von Monosacchariden und Polyolen.
Infusionstherapie 2 (1975), 187

70. FOSTER,L.B. and R.T.DUNN
Single antibody technique for radioimmunoassay of
cortisole in unextracted serum of plasma.
Clin.Chem. 20 (1974), 365

71. FRANK,H.A., A.M.SELIGMAN and J.FINE
Traumatic Shock XII, The prevention of irreversibility
in hemorrhagic shock by viviperifusion of the liver.
J.Clin.Invest. 25 (1946), 22

72. FREEDLENDER,A.E.
Preparation and stability of labelled preparations.
In: Protein and Polypeptide Hormones 45, Part 3,
Ed. M.Margoulies, International congress series,
Vol.161, pg 608
Amsterdam: Excerpta Medica Foundation

73. FREUND,J.
The Effect of paraffin oil and mycobacteria on anti-
body formation and sensitization.
Am.J.clin.Path. 21 (1951), 645

74. FROHMAN,L.A., L.L.BERNADIS
Effect of hypothalamic stimulation on plasma glucose,
insulin and glucagon levels.
Am.J.Physiol. 221 (1971), 1596

75. FUSSGÄNGER,R.D., K.STRAUB, R.GOBERNA, P.JAROS, K.E.SCHRÖDER,
S.RAPTIS, E.F.PFEIFFER
Primary secretion of insulin and secondary release of
glucagon from the perfused rat pancreas following
stimulation with pancreozymin.
Horm.Metab.Res. 1 (1969), 224

76. GADDUM,J.H.
Spec.Rep.Ser.Med.Res.Coun., 183, London 1933
zit. nach Feldman u. Rodbard, 1971

77. GALBO,H., J.J.HOST and N.J.CHRISTENSEN
Glucagon and plasma catecholamine responses to graded
and prolonged exercise in man.
Journal of Applied Physiology 38, No.1 (1975), 70

78. GERICH,J.E., J.H.KARAM and P.H.FORSHAM
Reciprocal adrenergic control of pancreatic alpha- and
beta-cell function in man.
Diabetes 21, Suppl.1 (1972), 332

79. GERICH,J.E., J.H.KARAM and P.H.FORSHAM
Stimulation of glucagon secretion by epinephrin in man.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 37 (1973), 479

80. GERICH,J.E., M.LANGLOIS, J.SCHNEIDER, J.H.KARAM, C.NOACCO
Effects of alterations of plasma free fatty acid levels on pancreatic glucagon secretion in man.
J.Clin.Invest. 53 (1974a), 1284

81. GERICH,J.E., M.LANGLOIS, C.NOACCO, J.SCHNEIDER, P.H.FORSHAM
Adrenergic modulation of pancreatic glucagon secretion in man.
J.Clin.Invest. 53 (1974b), 1441

82. GERICH,J.E., et al.
Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38 (1974c), 77-82

83. GERICH,J.E., M.LORENZI, E.TSALIKIAN and J.H.KARAM
Studies on the mechanism of ephinephrine-induced hyperglycemia in man.
Evidence for participation of pancreatic glucagon secretion.
Diabetes 25 (1976a), 65

84. GERICH,J.E., M.A.CHARLES, G.M.GRODSKY
Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion.
Annual Review of Physiology 38 (1976b), 353-388

85. GIDDINGS,A.E.B.
The control of plasma glucose in the surgical patient.
British Journal of Surgery 61 (1974a), 787

86. GIDDINGS,A.E.B., R.G.CLARK, K.J.O'CONNOR and N.R.LAZARUS
Plasma glucagon and insulin: glucagon ratios after abdominal surgery.
British Journal of Surgery 61 (1974b), 920

87. GIDDINGS,A.E.B., K.J.O'CONNOR, B.J.ROWLANDS, C.MANGNALL, R.G.CLARK
Hyperglycagonaemia in the surgical patient.
British Medical Journal 1 (1975), 570

88. GILMORE,J.P.
Response of estimated hepatic blood flow to graded hemorrhage and the infusion of levarterenol.
Am.J.Physiol. 195 (1958), 469

89. GIRARD,I., and F.C.GREENWOOD
The absence of intact growth hormone in urine as judged by radioimmunoassay.
J.Endocr. 40 (1968), 493-503

90. GLAZER,A.N.
In the prevalence of "nonspecific" binding at the specific binding sites of globular proteins.
Proceedings of the Nat.Acad.Sci. Vol.65, No.4 (1970), 1057-1063

91. GLICK,G., W.W.PARMLEY, A.S.WECHSLER and E.H.SONNENBLICK
Glucagon: its enhancement of cardiac performance in the cat and dog and persistance of its inotropic action despite betareceptor blockade with propranolol.
Circ.Res. 22 (1968), 789

92. GOBIET,W., U.WERNER, K.HACKENBERG
Verlaufsuntersuchungen zum Verhalten des Hypophysenvorderlappens, der Nebennieren sowie der biogenen Amine nach schweren Schädel-Hirn-Traumen.
In: Schmidt,K., K.Schultis, Neurogener Schock, F.K.Schattauer-Verlag (1976), 9

93. GÖGLER,E.
Der schwere Unfall in der modernen Industriegesellschaft.
Langenbecks Arch.Chir. 329 (1971), 922

94. GOODFRIEND,T.L., L.LEVINE, G.D.FASMAN
Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology.
Science 144 (1964), 1344

95. GREEN,H.N., H.B.STONER, H.J.WHITELY, D.EGLEIN
The effect of trauma on the chemical composition of the blood and tissues of man.
Clin.Sci. 8 (1949), 65

96. GREENWOOD,F.C.
The radioimmunoassay of peptide hormones.
Br.J.Hosp.Med. 2 (1969), 764

97. GREENWOOD,F.C., W.M.HUNTER and J.S.GLOVER
The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem.J. 89 (1963), 114

98. GREGORY,R.A., and H.J.TRACY
The constitution and properties of two gastrins extracted from dog antral mucosa.
Gut 5 (1964), 103

99. GROSS,R., and P.MIALHE
Free fatty acid - glucagon feed-back mechanism.
Diabetologia 10 (1974), 277

100. HALMAGYI,D.F., D.J.GILLETT, L.LAZARUS and J.D.YOUNG
Blood glucose and serum insulin in reversible and irreversible posthemorrhagic shock.
J.Trauma 6 (1966), 623-629

101. HALMAGYI,D.F.J., M.H.IRVING and D.J.GILLETT
Course of posthemorrhagic hypotension after celiac anglionectomy with and without adrenal denervation.
Ann.Surg. 166 (1967), 222-227

102. HALMAGYI,D.F.J., I.R.NEERING, L.LAZERUS, J.D.YOUNG and J.PULLIN
Plasma glucagon in experimental posthemorrhagic shock.
The Journal of Trauma 9 (1969), 320

103. HALES,C.N., and R.D.G.MILNER
The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas.
J.Physiol. 194 (1968), 725

104. HANQUET,M., A.CESSION-FOSSION, J.LECOMTE
Changes in catecholamine levels during shock in man.
Can.Anaesth.Soc.J. (1970), 208

105. HARDAWAY,R.M.
Clinical management of shock.
Ch.Thomas Springfield III (1968)

106. HART,J., u. R.LICK
Das Verhalten des Aminosäurestickstoffes im Blut und seine Ausscheidung im Urin bei intravenöser Infusion von Proteinhydrolysaten.
Anaesth. 13 (1964), 35

107. HARTEL,W.
Pathophysiologie des Schocks beim Polytraumatisierten.
Vortrag auf der Mittelrheinischen Chirurgentagung in Frankfurt 25.-27.10.1973

108. HAUSDÖRFER,J., W.HELLER, H.JUNGE, R.PREGER
Veränderungen des Lipidstoffwechsels nach akutem experimentellem Schädel-Hirntrauma.
Med.Welt 27 (NF) (1976), 426

109. HAZZARD,W.R., P.M.CROCKFORD, K.D.BUCHANAN, J.E.VANCE, R.CHEN, R.H.WILLIAMS
A double antibody immunoassay for glucagon.
Diabetes 17 (1968), 179

110. HEDING,L.G.
A simplified insulin radioimmunoassay method.
In: L.Danato, G.Milhand and J.Suchis, Labelled Proteins in Tracer Studies, Euratom, Brussels (1966), 345

111. HEDING,L.G.
The production of glucagon antibodies in rabbits.
Horm.Met.Res. 1 (1969), 87

112. HEDING,L.G.
Radioimmunological determination of pancreatic and gut glucagon in plasma.
Diabetologia 7 (1971), 10-19

113. HEDING,L.G.
Immunologic properties of pancreatic glucagon: antigenicity and antibody characteristics.
In: "Glucagon, molecular physiology clinical and therapeutic implications", Ed.P.J.Lefebvre and R.H.Unger, Pergamon Press, Oxford (1972), 187-200

114. HEMPELMANN,G., H.ARDALAN, S.PIEPENBROCK, U.HELMS and C.WESTERMANN
Über die Wirkung von intermittierenden Glukagon-Gaben auf den Kreislauf in der postoperativen Frühphase nach herzchirurgischen Eingriffen.
Zeitschrift für Kardiologie 63 (1974), 511

115. HENQUIN,J.C., P.MALVAUX and A.E.LAMBERT
Glucagon immunoassay using polyethylene glycol to precipitate antibody-bound hormone.
Diabetologia 10 (1974), 61

116. HERBERT,V., K.LAU, C.W.GOTTLIEB, S.L.BLEICHER
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J.Clin.Endocrin. 25 (1965), 1375

117. HIFT,H., and J.G.STRAWITZ
Irreversible hemorrhagic shock in dogs: problem of onset of irreversibility.
Amer.J.Physiol. 200 (1961), 269

118. HOCKFELT,B., S.B.BYDEMAN, J.SEKKENES
The participation of the adrenal glands in endotoxin shock.
In: Shock, pathogenesis and therapy, Springer, Berlin (1962), 151

119. HOLST,J.J.
The interactions of the glucagon receptor of liver cell membranes with pancreatic and gut type glucagons.
In: P.P.Foa, J.S.Bajai and N.L.Foa, Glucagon: Its Role in Physiology and Clinical Medicine. Springer, New York, Heidelberg, Berlin (1977), 287-304

120. HOLST,J.J.
Extrapancreatic Glucagons.
Digestion 17 (1978), 168-190

121. HOLST,J.J., and B.AASTED
Production and evaluation of glucagon antibodies for radioimmunoassay.
Acta endocr.Copenhagen 77 (1974), 715-726

122. HOLTZ,P., and D.PALM
Brenzcatecholamine und andere sympathicomimetische Amine.
Ergebn.Physiol. 58 (1966), 1

123. HOWARD,J.M.
Studies of the absorption and metabolism of glucose following injury.
Ann.Surg. 141 (1955), 321

124. HUANG et al.
Anal.Chem. 33 (1961), 1405

125. HUNTER,W.M.
Jodination of protein compounds.
In: Radioactive Pharmaceuticals, Eds. G.A.Andrews, R.M.Kinseley and H.N.Wagner, Atomic Energy Commission Symposium Series No.9, Oak Ridge, Tennessee (1966)

126. HUNTER,W.M.
The preparation and assessment of iodinated antigens.
In: Radioimmunoassay Methods, Eds. K.E.Kirkham und W.M.Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 3-23

127. HUNTER,W.M., and F.C.GREENWOOD
Preparation of jodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, London, 194 (1962), 495

128. HUNTER,W.M., BENNIE,J., and LANDON
Specifity: Interference by substances unrelated to the antigen.
In: Radioimmunoassay Methods, Eds. K.E.Kirkham u. W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 210-215

129. HUNTER,W.M., and P.C. GANGULI
The separation of antibody bound from free antigen.
In: Radioimmunoassay Methods, Eds. K.E.Kirkham u. W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 243-257

130. HURN,B.A.L., and J.LANDON
Antisera for radioimmunoassay.
In: Radioimmunoassay Methods, Eds. K.E.Kirkham and W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971), 121-142

131. HUTH,K.
Veränderung der Blutfette bei verschiedenen Schockmodellen.
Med.Welt 22 (NF) (1971), 1173

132. IVERSEN,J.
Secretion of glucagon from the isolated perfused canine pancreas.
J.Clin.Invest. 50 (1971), 2123

133. IVERSEN,J.
Adrenergic receptors for the secretion of immunoreactive glucagon and insulin from the isolated, perfused canine pancreas.
Diabetologia 7 (1971), 485

134. JÄÄTTELÄ,A.
Effect of traumatic shock on plasma catecholamine levels in man.
Ann.Clin.Res. 4 (1972), 204

135. JÄÄTTELÄ,A., A.ALHO, V.AVIKAINEN, E.KARAHARJU, J.KATAJA
Plasma catecholamines in severely injured patients, a prospective study on 45 patients with multiple injuries.
Brit.J.Surg. 62 (1975), 177

136. JØRGENSEN,K.H., and U.D.LARSEN
Purification of ^{125}J-glucagon by anion exchange chromatography.
Horm.Metab.Res. 4 (1972), 223-224

137. JOHNSTON,D.J., and S.R.BLOOM
Plasma glucagon levels in the full-term human infant and the effect of hypoxia.
Archives of Disease in Childhood (1973)

138. JOHNSTON,J.D.A.
The metabolic and endocrine response to injury: A review.
Brit.J.Anaesth. 45 (1973), 252

139. JORDAN,G.L., E.P.FISHER, E.A.LEFRATZ
Glucose metabolism in traumatic shock in human.
Ann.Surg. 175 (1972), 685

140. KÄSER,H.
Die diagnostische Bedeutung der Bestimmung der Katecholamine und ihrer Metaboliten.
Schweiz.Med.Wschr. 96 (1966), 258

141. KANETO,A., E.MIKI, K.KOSAKA
Effects of vagal stimulation on glucagon and insulin secretion.
Endocrinology 95 (1974), 1005

142. KANETO,A., H.KAJINUMA, K.KOSAKA
Effect of splanchnic nerve stimulation on glucagon and insulin output in the dog.
Endocrinology 96 (1975a), 143

143. KANETO,A., E.MIKI, K.KOSAKA
Effect of beta and beta$_2$ adrenoreceptor stimulants infused intrapancreatically on glucagon and insulin secretion.
Endocrinology 97 (1975b), 1166

144. KASTIN,A.J., W.D.HAWLEY, M.C.MILLER, A.V.SONALLY, C.LANCASTER
Plasma MSH and cortisol levels in 567 patients with special reference to brain trauma.
Endocrin.Exper. 8 (1974), 97

145. KEHLET,H., P.NIKKI, A.JÄÄTTELÄ
Plasma catecholamine concentrations during surgery in unsupplemented glucocorticoid-treated patients.
Brit.J.Anaesth. 46 (1974), 73

146. KENNY,A.J.
Inactivation of glucagon by tissues in vitro.
Ann.J.Physiol. 186 (1956), 419

147. KESSLER,G., and M.WOLFMANN
Clin.Chem. 33 (1961), 1405

148. KIRKHAM,K.E., and W.M.HUNTER
Radioimmunoassay Methods.
Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971)

149. KHORANA,H.G.
The chemistry of carbodimides.
Chem.Rev. 53 (1953), 145

150. KITANI,K., Y.SUZUKI, R.MIURA
Differences in the effects of secretin and glucagon on the blood circulation of unanesthetized rats.
Acta Hepato-Gastroenterologica 25 (1978), 470-473

151. KLÜTSCH,K.
Die Niere im Schock.
In: Klinik und Therapie des Schocks, III. Symposium, Ed. D.Mohring, Sanderbush (1972)

152. KOCK,N.G., S.TIBBLIN, and W.G.SCHENK
Hemodynamic responses to glucagon: An experimental study of central, visceral and peripheral effects.
Ann.Surg. 171 (1970), 373

153. KOSLOWSKI,L., U.BRAUN, E.VOIGT und J.DURST
Ätiologie und Pathophysiologie des Polytraumas.
Intensivbehandlung 1 (1976), 5

154. KREMER,K., und M.SAILER
Dringlichkeitsfragen bei der Erstversorgung kombinierter und Mehrfachverletzungen - Thoraxverletzungen.
Langenbecks Arch.klin.Chir. 329 (1971), 757

155. KROUPA,J.
Problematik der Mehrfachverletzungen mit Beteiligung der Extremitäten.
Act.Chir. 7 (1972), 351

156. KUZUYA,T., und E.SAMOLS
The plasma insulin 'inhibitor' and immunoprecipitation system.
Metabolism 13 (1964), 493

157. KUZUYA,T., H.KAJINUMA, T.IDE
Effect of intrapancreatic injection of potossium and calcium on insulin and glucagon secretion in dogs.
Diabetes 23 (1974), 55

158. LANIADO,S., P.SEGAL, B.ESRIG
The role of glucagon hypersecretion in the pathogenesis of hyperglycemia following acute myocardial infarction.
Circulation 48 (1973), 979

159. LARSSON,L.-I., J.HOLST, R.HAKANSON and H.SUNDLER
Distribution and properties of glucagon immunoreactivity in the digestive trad of various mammals: an immuno-histochemical and immunochemical study.
Histochemistry 44 (1975), 281-290

160. LAVES,W., and S.BERG
Agonie.
M.Schmidt-Römhild, Lübeck (1965)

161. LAWRENCE,A.M.
Radioimmunoassayable glucagon levels in man: Effects of starvation, hypoglycemia and glucose administration.
Proc.Nat.Acad.Sci. 55 (1966), 316

162. LECLERCQ-MEYER,V., P.MIAHLE und W.J.MALAISSE
Une methode de dosage radioimmunologique du glucagon comportant une separation par le carbon-dextren.
Diabetologia 6 (1970), 121

163. LECLERCQ-MEYER,V., G.R.BRISSON, W.J.MALAISSE
Effect of adrenaline and glucose on release of glucagon and insulin in vitro.
Nature New Biol. 231 (1971), 248

164. LEFEBVRE,P.J., A.S.LUYCKX, A.H.NIZET
Renal handling of endogenous glucagon in the dog: comparison with insulin.
Metabolism 23 (1974), 753

165. LEFEBVRE,P.J., and A.S.LUYCKX
Effect of acute kidney exclusion by ligation of renal arteries on peripheral plasma glucagon levels and pancreatic glucagon production in the anaesthetized dog.
Metabolism 24 (1975), 1169

166. LEFEBVRE,P.J., and A.S.LUYCKX
Plasma glucagon after kidney exclusion: Experiments in somatostatin-infused and in eviscerated dogs.
Metabolism 25 (1976a), 761

167. LEFEBVRE,P.J., A.S.LUYCKX and A.H.NIZET
Independence of glucagon and insulin handling by the isolated perfused dog kidney.
Diabetologia 13 (1976b), 359

168. LEVENSON,S.M., J.M.HOWARD und H.ROSEN
Surg.Gynecol.Obstet. 101 (1955), 35

169. LEVY,M.
The effect of glucagon on the glomerular filtration rate in dogs during reduction of renal blood flow.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 53 (1975), 660

170. LEVY,M., and N.L.STARR
The mechanism of glucagon-induced natriuresis in dogs.
Kidney Int. 2 (1972), 76

171. LINDBERG,B.
Liver circulation and metabolism in haemorrhagic shock.
Acta Chir.Scand. (Suppl.476) (1977), 1-18

172. LINDSEY,C.A., D.W.WILMORE, J.A.MOYLAN, G.R.FLOONA and R.H.UNGER
Glucagon and the insulin: glucagon (I/G) ratio in burns and trauma.
Clinical Research 20 (1972), 802

173. LINDSEY,C.A., F.SANTEUSANIO, J.BRAATEN, G.R.FALOONA, R.H.UNGER
Pancreatic alpha-cell function in trauma.
JAMA (Journal of American Medical Association) 227 (1974a), 757

174. LINDSEY,C.A., G.R.FALOONA, and R.H.UNGER
Glucagon and the insulin: glucagon ratio in severe trauma.
Transactions of the Association of American Physicians 86 (1974b), 264

175. LINDSEY,C.A., G.R.FALOONA, R.H.UNGER
Plasma glucagon levels during rapid exsangination with and without adrenergic blockade.
Diabetes 24 (1975), 313

176. LINHARDT,J.W., S.S.BAROLD, L.S.COHEN, F.J.HILDNER and P.SAMET
Cardiovascular effects of glucagon in man.
Am.J.Cardiol. 22 (1968), 706

177. LLAURADO,J.G., and F.A.WOODRUFF
Postoperative transient aldosteronism.
Surg. 42 (1957), 313

178. LUCCHESI,B.R.
Cardiac effects of glucagon.
Circ.Res. 22 (1968), 777

179. LUDERITZ,B., H.AVENHAUS und C.D.SEUFERT
The effects of glucagon on the extracellular potassium concentration. Measurement in aorta, hepatic vein and coronary sinus in man.
Klin.Wschr. 49/24 (1971), 1334

180. LUNDQUIST,I.
Insulin secretion: Its regulation by monamines and acid amyloglucosidase.
Acta Physiol.Scand.Suppl.372 (1971), 3

181. LUNDQUIST,I.
Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation.
I. ß-adrenergic blockade
Eur.J.Pharmacol. 18 (1972a), 213

182. LUNDQUIST,I.
Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation.
II. ß-adrenergic blockade
Eur.J.Pharmacol. 18 (1972b), 225

183. LUNDQUIST,G., J.EDWARDS and L.WIDE
A solid phase radioimmunoassay for pancreatic glucagon.
Upsala J.Med.Sci. 81 (1976), 65

184. LUYCKX,A.S.
Immunoassays for Glucagon.
In: "Glucagon, Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications", Eds. Lefebvre,P.J. und R.H.Unger, Pergamon Press, Oxford (1972), 285-298

185. LUYCKX,A.s., and P.J.LEFEBVRE
Arguments for a regulation of pancreatic glucagon secretion by circulating plasma free fatty acids.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133 (1970), 524

186. LUYCKX,A.S., and P.LEFEBVRE
Exercise-induced glucagon secretion.
Postgraduate Medical Journal (Aug.Suppl.) 49 (1973), 620

187. MACIK,J.
Polytraumatismus.
Hefte Unfallheilkunde 89 (1966), 145

188. MALAISSE,W.J.
Hormonal and environmental modification of islet activity.
In: Handb.Physiol.Endocrinology Sec.7, Vol.I (1972), 237-60
Ed. R.O.Greep, E.B.Astwood, Washington DC: Am.Physiol.Soc.

189. MANGER,W.M., J.L.BOLLMAN, F.T.MAHLER, J.BERKSON
Plasma Concentration of epinephrine in hemorrhagic and anaphylactic shock.
Am.J.Physiol. 190 (1957), 310

190. MARCO,J., C.CALLE, D.ROMAN, M.DIAZ-FIERROS, M.L.VILLANEVA and J.VALVERDE
Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man.
New England Journal of Medicine 288 (1973), 128

191. MARCO,J., C.CALLE, J.A.HEDO and M.L.VILLANEVA
Enhanced glucagon secretion by pancreatic islets from prednisolone-treated mice.
Diabetologia 12 (1976), 307

192. MARLISS,E.B., L.GIRARDIER, J.SEYDOUX, C.B.WOLLHEIM, Y.KANAZAWA, L.ORCI, A.E.REYNOLD and D.PORTE
Glucagon release induced by pancreatic nerve stimulation in the dog.
J.clin.Invest. 52 (1973), 1246

193. MARSH et al.
Clin.Chem. 5 (1959), 119

194. MASHITER,K., P.E.HARDING, M.CHOU, G.D.MASHITER, J.STOUT, D.DIAMOND and J.B.FIELD
Persistant pancreatic glucagon but not insulin response to arginine in pancreatectomized dogs.
Endocrinology 96 (1975), 678-693

195. MATSUYAMA,A.T., and P.P.FOA
Plasma glucose, insulin, pancreatic and enteroglucagon levels in normal and depancreatized dogs.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 147 (1974), 97-102

196. MEGUID,M.M., M.F.BRENNAN, W.A.MULLER, T.T.AOKI
Glucagon and Trauma.
The Lancet, Nov. 1972, 1145

197. MEGUID,M.M., M.F.BRENNAN, T.T.AOKI, W.A.MULLER, M.R.BALL and F.D.MOORE
The role of insulin and glucagon in acute trauma.
Surgical Forum 24 (1973), 97

198. MEGUID,M.M., M.F.BRENNAN
Hyperglukagonaemia after burns.
The Lancet, Feb. 1974, 319

199. MENG,C.H.
Changes in Lipid Metabolism under stress.
In: Stoffwechsel, Ed. Lang,K., R.Frey, M.Halmagyi, Anaesthesie und Wiederbelegung 58 (1972), 66
Springer, Berlin

200. MILLAR,R.A., and B.G.BENFEY
The fluorimetric estimation of adrenalin and noradrenalin during hemorrhagic hypotension.
Brit.J.Anaest. 30 (1958), 158

201. MORITA,S., K.DOI, C.C.YIP and M.VRANIC
Measurement and partial characterization of immunoreactive glucagon in gastrointestinal tissues of dogs.
Diabetes 25 (1976), 1018-1025

202. MORRIS,H.G., G.De ROCHE, M.EARLE
Effect of corticosteroid treatment on urinary epinephrine response to induced hypoglycemia in asthmatic children.
J.Pharmacol.exp.Ther. 184 (1973), 180

203. MÜLLER,W.A., G.R.FALOONA and R.H.UNGER
The effect of alanine on glucagon secretion.
J.Clin.Invest. 50 (1971), 2215

204. MÜLLER,W.A., T.T.AOKI, G.F.CAHILL
Effect of alanine and glycine on glucagon secretion in postabsorptive and fasting obese man.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 40 (1975), 418

205. MURLIN,J.R., H.D.CLOUGH, C.B.F.GIBBS and A.M.STOKES
Aqueous extract of pancreas, 1. influence of the carbohydrate metabolism of depancreatized animals.
J.Biol.Chem. 56 (1923), 253-296

206. NAKAMURA,R. In: Eds. Daughaday,W.H. and L.S.Jacobs:
Methods of separating antibody-bound from free antigen.
In: Principles of Competitive Protein-Binding Assays, Eds. W.D.Odell and W.H.Daughaday, Lippincott, Philadelphia (1971), 317-318

207. NARAHARA,H.T., and H.WILLIAMS
Degradation of glucagon-J^{131} by rat tissues in vitro.
Endocrinology 60 (1957), 285

208. NARAHARA,H.T., M.B.EVERETT, B.S.SIMMONS, R.H.WILLIAMS
Metabolism of insulin-J^{131} and glucagon-J^{131} in the kidney of the rat.
Amer.J.Physiol. 192 (1958), 227

209. NONAKA,K., und P.P.FOA
A simplified immunoassay and its use in a study of incubated pancreatic islets.
Proc.Soc.Exp.Biol. 130 (1969), 330

210. NESS,A.T.
Clin.Chem.Acta 12 (1965), 532

211. ODELL,W.D.
In: Odell u. Daughaday, Principles of Competitive Protein Binding Assays, Lippincott, Philadelphia (1971), 323

212. ODELL,W.D., G.ABRAHAM, H.R.RAND, R.S.SWERDLOFF und D.A.FISHER
In: First Karolinska Symposium in Reproductive Endocrinology, Diczfalusy,E. (Ed.), Bogtrykkeriet Forum, Kopenhagen (1969), 54

213. ODELL,W.D., G.A.ABRAHAM, W.R.SKOWSKY, M.A.HESCOX and D.A.FISHER
Production of antisera for radioimmunoassay.
In: Odell u. Daughaday, Principles of Competitive Protein Binding Assays, Lippincott, Philadelphia (1971)

214. ØRSKOV,H.
Wick-chromatography for the immunoassay of insulin.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 20 (1967), 297

215. OHNEDA,A., A.M.EISENTRAUT
Effects of gut hormone in insulin and glucagon secretion.
Acta Diab. Latina 5 (1968a), 499-512

216. OHNEDA,A., E.PARADA, A.M.EISENTRAUT und R.H.UNGER
Characterization of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids.
J.Clin.Invest. 47 (1968b), 2305

217. OHNEDA,A., E.AQUILAR-PARADA, A.M.EISENTRAUT, R.H.UNGER
Control pf pancreatic glucagon secretion by glucose.
Diabetes 18 (1969), 1-10

218. OHNEDA et al.
Plasma glucagon responses to blood glucose fall, gastro-intestinal hormones and arginine in man.
Tohoku J.Exp.Med. 107 (1972), 241-51

219. PALM,D., und E.APPEL
Sympatho-nervale und sympatho-adrenale Aktivität.
In: Neurogener Schock, Hrsg. Schmidt K., K.Schultis, F.K.Schattauer, Stuttgart (1976)

220. PALMER,J.P. und J.W.ENSINCK
Stimulation of glucagon secretion by ethanol-induced hypoglycemia in man.
Diabetes 24 (1975), 295

221. PARKER,C.W.
Nature of immunological responses and antigen-antibody interaction.
In. Principles of Competitive Protein-Binding Assays, Eds. Odell and Daughaday, J.B.Lippincott Comp., Philadelphia (1971), 25-56

222. PARKER,C.W., S.M.GODT und M.C.JOHNSON
Fluorescent probes for the study of the antibody-hapten reaction. II. Variation in the antibody combining site during the immune response.
Biochemistry 6 (1967), 3417

223. PASSAU,P.G., und J.D.PEULER
A simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine.
Analyt.Biochem. 51 (1973), 618

224. PAUL,W.E., G.W.SISKIND und B.BENACERRAF
Specifity of cellular immune response.
J.Exp.Med. 127 (1968), 25

225. PINARDI,G., E.SANTIAGO and J.V.VASQUEZ
Cardiovascular response to glucagon in hypovolemic dogs.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 53 (1975), 211

226. PORTE,D.Jr., A.L.GRABER, T.KUZUYA und R.H.WILLIAMS
The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levens in man.
J.Clin.Invest. 45 (1966), 228

227. PORTE,D., L.GIRARDIER, J.SEYDOUX, Y.KANAZAWA, J.PASTERNAK
Neural regulation of insulin secretion in the dog.
J.Clin.Invest. 52 (1973), 210

228. PRESSMANN,D. and A.L.GROSSBERG
The structural basis of antibody specifities.
W.A.Benjamin, New York (1968)

229. PROBST,G.W. and R.W.COLWELL
Biochem. 5 (1966),1209
zitiert nach Heding,L.G., 1972

230. RACKWITZ,R., H.JAHRMÄRKER, K.PRECHTEL, K.THEISEN, H.GROHMANN
Hypoglykämie während Kreislaufschock.
Klin.Wschr. 52 (1974), 605

231. ROCHA,D.M., G.R.FALOONA und R.H.UNGER
Glucagon stimulating activity of 20 amino acids in dogs.
J.Clin.Invest. 51 (1972), 2346

232. RODBARD,D., W.BRIDSON und P.L.RAYFORD
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J.Lab.Clin.Med. 74 (1969), 770

233. ROKKANEN,P., J.JUSSILA, S.PAATSAMA, M.LAHDENSUN, W.MÄKELÄ, V.C.EHNHOLM, G.MYLLYLÄ
Traumatic shock after severe limb tissue damage in pigs.
Acta chir.scand. 140 (1974), 85

234. ROSSELIN,G., R.ASSAN, R.S.YALOW und S.A.BERSON
Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with Jodine 131 by talcum powder and precipitated silica.
Nature, London 212 (1966), 355

235. ROYER,M.E. und KO,H.
Anal.Biochem. 29 (1969), 403

236. RUSSEL,R.C.G., C.J.WALKER, S.R.BLOOM
Hyperglucagonaemia in the surgical patient.
Brit.Medical Journal 1 (1975), 10

237. SAITO,S.
Effect of hemorrhage upon the rate of literation of epinephrine from the suprarenal gland of dogs.
Tohoku, J.exp.Med. 11 (1928), 79

238. SAMOLS,E., G.MARII und V.MARKS
Interrelationship of glucagon, insulin and glucose: the insulinogenic effect of glucagon.
Diabetes 15 (1966), 855

239. SANTEUSIANO,F., D.M.ROCHA, G.R.FALOONA, W.MULLER and R.H.UNGER
The role of glucagon in the worsening of the diabetic state induced by infection.
Diabetes 21 (Suppl.) (1972), 324

240. SANTEUSIANO,F., G.R.FALOONA, J.P.KUSCHEL and R.H.UNGER
Evidence for a role of endogenous insulin and glucagon in the regulation of potasium homeostasis.
J.Lab.Clin.Med. 81 (1973), 809

241. SCATCHARD,G.
Ann. N.Y. Acad.Sci. 51 (1949), 660

242. SCHENK,H.von
Production and characterization of an antiserum against pancreatic glucagon.
Clin.Chim.Acta 80 (1977), 455-463

243. SCHMIDT,M.
Anorganische Chemie.
Bibliogr.Institut Mannheim, Hochschultaschenbücher Verlag, 1967

244. SCHRÖDER,K.E., S.RAPTIS, F.PFEIFFER
Differences in the alpha-and beta-cytotropic effect of pancreozynin in normal and diabetic subjects.
4.Kongress Dtsch.Diab.Ges. Ulm, 1969,
Diabetologia 6 (1970), 81

245. SCHWEIBERER,L. und K.SAUER
Pathophysiologie der Mehrfachverletzung.
Langenb.Arch.Chir. 337 (1974), 149

246. SCHUMER,W., B.MILLER, R.L.NICHOLS, G.O.McDONALD and L.M.NYHUS
Metabolic and microcirculatory effects of glucagon in hypovolemic shock.
Arch.Surg. 107 (1973), 176

247. SELYE,H.
A Syndrom produced by diverse noxious agents.
Nature (London) 138 (1936), 32

248. SELYE,H., C.DOSNE
Influence of traumatic shock on blood of adrenal-ectomized rats treated with adrenal cortical extract.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 48 (1941), 532

249. SENYK,G., D.NITECKI, J.W.GOODMAN
Immunogenicity of glucagon: Determinants responsible for antibody binding and lymphocyte stimulation.
Science 171 (1971a), 407

250. SENYK,G., E.B.WILLIAMS, D.E.NITECKI, J.W.GOODMAN
The functional dissection of an antigen molecule: Specifity of humoral and cellular immune responses for glucagon.
J.exp.Med. 133 (1971b), 1294

251. SENYK,G., D.E.NITECKI, L.SPITLER, J.W.GOODMAN
The immune response to glucagon in conjugated form.
Immunochemistry No.2 (1972), 97

252. SHEEHAN,J.C., and G.P.HESS
A new method of forming peptide bonds.
J.Am.Chem.Soc. 77 (1955), 1067

253. SHEEHAN,J.C., P.A.CRUICKSHANK, G.L.BOSHART
J.Org.Chem. 21 (1956), 439

254. SHEEHAN,J.C., and HLAVKA,J.J.
ibid 21 (1956), 439

255. SHIMA,K., and P.P.FOA
A douple antibody assay for glucagon.
Clin.Chim.Acta 22 (1968), 511

256. SHIMA,K., N.SAWAZAKI, R.TANAKA, S.TARUI and M.NISHIKAWA
Effect of chloramine-T on the immunoreactivity of glucagon.
Endocrinology 96 (1975), 1254-1260

257. SHOEMAKER,W.C., and T.B. VAN ITALLIE
The hepatic response to glucagon in the unanesthetized dog.
Endocrinology 66 (1960), 260

258. SHOEMAKER,W.C., L.J.STAHR, S.J.KIM and D.H.ELWYN
Sequential circulatory and metabolic changes in the liver and whole body during hemorrhagic shock.
Adv.Exp.Med.Biol. 33 (1973), 293

259. SHOPMAN,W., W.H.L.HACKENG und C.STEENDIJK
The purification of 125-J-glucagon of high specific activity for radioimmunochemical estimation of glucagon and a quantitative comparison of glucagon from different sources.
Acta Endocrinologica 54 (1967), 527

260. SINAGOWITZ,E., H.RAHMER, R.RINK, M.KESSLER
Die Sauerstoffversorgung von Leber, Pankreas, Duodenum, Niere und Muskel während des hämorrhagischen Schocks.
Langenb.Arch.Chir.Suppl.chir.Forum (1974), 301

261. STAUB,A., L.SINN and O.K.BEHRENS
Purification and crystallization of hyperglycemic glycogenolytic factor (HGF).
Science 117 (1953), 628

262. STEENBURG,R.W., und W.F.GANGOUG
Observations on the influence of extraadrenal factors in circulating 17-hydroxycorticoids in surgially stressed adrenalectomized animals.
Surg. 38 (1955), 92

263. SUNDBY,F., H.JACOBSEN and A.J.MOODY
Purification and characterization of a protein from procine gut with glucagon-like immunoreactivity.
Hormone Metab.Res.8 (1976), 366-371

264. UNGER,R.H.
Glucagon and the insulin-glucagon ratio in diabetes and other catabolic illnesses.
Diabetes 20 (1972), 834

265. UNGER,R.H., and A.M.EISENTRAUT
Etudes recents sur la physiologie du glucagon.
In: Journees Annuelles de Diabetologie de l'Hotel-Dieu Medicales Flammarion, Paris (1967), 7-18

266. UNGER,R.H., EISENTRAUT,A.M., MC CALL,M.S., KELLER,S., LANZ, A.C., and MADISON,L.L.
Glucagon antibodies and their use for immunoassay of glucagon.
Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 102 (1959), 621

267. UNGER,R.H., A.M.EISENTRAUT, M.S.MC CALL and L.L.MADISON
Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon.
J.Clin.Invest. 40 (1961), 1280

268. UNGER,R.H., A.M.EISENTRAUT, M.S.MC CALL, L.L.MADISON, K.R.SIMS and L.PATMAN
Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion.
J.Clin.Invest. 41 (1962), 682-689

269. UNGER,R.H., A.M.EISENTRAUT, L.L.MADISON
The effects of total starvation upon the levels of circulating glucagon and insulin in man.
J.clin.Invest. (1963), 1031

270. UNGER,R.H., H.KETTERER, J.DUPRE and A.M.EISENTRAUT
The effects of secretin, pancreozynin and gastrin on insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs.
J.Clin.Inv. Vol.46, No.4 (1967), 630-645

271. UNGER,R.H., A.M.EISENTRAUT, H.KETTERER
Enteroinsular Axis.
Arch.Intern.Med. 123 (1969), 261-266

272. UNGER,R.H., E.AGUILAR-PARADA, W.A.MÜLLER and A.M.EISENTRAUT
Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects.
J.Clin.Invest. 48 (1970), 837

273. UNGER,R.H., W.A.MÜLLER and G.R.FALOONA
Insulin/glucagon (I/G) ratio.
Trans.Assoc.Am.Physicians 84 (1971), 122

274. UNGER,R.H., and L.ORCI
Physiology and pathophysiology of glucagon.
Physiological Reviews 56 (4) (1976), 778

275. VALVERDE,J., D.RIGOPOULON, J.MARCO, G.R.FALOONA and R.H.UNGER
Characterization of glucagon-like immunoreactivity (GLI).
Diabetes 19 (9) (1970), 614-623

276. WEICHSELBAUM,T.E.
Amer.J.Clin.Path.7 (1946), 40

277. WEINGES,K.F.
In: Labelled Proteins in Tracer Studies.
Ed.European Atomic Energy Community Euratom (1968), 271

278. WEIR,G.C., R.C.TURNER, D.B.MARTIN
Glucagon radioimmunoassay using antiserum 30 K:
Interference by plasma.
Horm.Metab.Res. 5 (1973), 241-244

279. WEIR,G.C., S.D.KNOWLTON, D.B.MARTIN
Glucagon secretion from the perfused rat pancreas.
Studies with glucose and catecholamines.
J.Clin.Inv. 54 (1974), 1403-12

280. WILLERSON,J.T., D.R.HUTCHESON, S.J.LESHIN, G.R.FALOONA, R.H.UNGER
Serum glucagon and insulin levels and their relationship to blood glucose values in patients with acute myocardial infarction and acute coronary insufficiency.
The American Journal of Medicine 57 (1974), 747

281. WILMORE,D.W., J.A.MOYLAN, C.A.LINDEY, G.R.FALOONA, R.H.UNGER; B.A.PRUITT
Hyperglucagonemia following thermal injury: insulin and glucagon in the posttraumatic catabolic shock.
Surgical Forum 24 (1973), 99

282. WILMORE,D.W., L.M.LONG, A.D.MASON
Catecholamines: mediator of the hypermetabolic response to thermal injury.
Ann.Surg. 180 (1974), 653

283. WISE,J.K., R.HENDLER and P.FELIG
Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man.
J.clin.Invest. 52 (1973), 2774

284. WISE,J.K., R.HENDLER, P.FELIG
Evaluation of alpha-cell function by infusion of alanine in normal, diabetic and obese subjects.
N.Engl.J.Med. 288 (1973), 487

285. WISE,J.K., R.HENDLER and P.FELIG
Hyperglucagonemia: a new mechanism for the diabetogenic effects of glucocorticoids.
J.Clin.Invest. 53 (1974)

286. WOLLHEIM,C.B., B.BLONDEL, A.E.RENOLD and G.W.C.SHARP
Calcium induced glucagon release in monolayer culture of the endocrine Pancreas.
Studies with inophore A 23 187.
Diabetologia 12 (1976), 287

287. WOODS,S.C., D.PORTE
Neural control of the endocrine pancreas.
Physiol.Rev. 54 (1974), 596

288. YALOW,R.S., and BERSON,S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.clin.Inv. 39 (1960), 1157-1175

289. YALOW,R.S., and S.A.BERSON
Purification of ^{131}J parathyroid hormone with microfine granules of precipitated silica.
Nature, London 212 (1966), 357

290. YALOW,R.S., and S.A.BERSON
In: Radioisotopes in Medicine: In vitro studies,
Hayes,R.L., F.A.Goswitz und B.G.P.Murphy (Eds.),
US Atomic Energy Commission, Oak Ridge (1968), 7

291. YALOW,R.S., N.VARSANO-AHARAN, E.EDEFMENDIA, S.A.BERSON
HGH and ACTH secretory responses to stress.
Horm.Metab.Res. 1 (1969), 3

292. YALOW,R.S., und S.A.BERSON
In: Statistics in Endocrinology, McArthur,J.W. und T.Colton (Eds.), MIT Press, Cambridge (1970), 327

293. YALOW,R.S., und S.A.BERSON
Problems of validation of radioimmunoassays.
In: Principles of Protein-Binding Assays,
Eds. Odell and Daughaday, Lippincott, Philadelphia (1971), 1-24

294. YOUNG,J.G., and J.GRAY
Biochemical response to trauma III. Epinephrine and norepinephrine levels in plasma of rats subjected to trumbling trauma.
Amer.J.Physiol. 186 (1956), 67

7. ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B	"Bound" = gebundenem Anteil des Antigens
BE	Base-Excess
CDI	Carbodiimid
F	freier, nicht an Antikörper gebundener Teil des Antigens
Hb	Hämoglobin
Hb_E	Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten
Hk	Hämatokrit
MG	Molekulargewicht
n	Anzahl der Probanden
RIA	Radioimmunoassay
T	"Total" = Totalaktivität einer RIA-Probe = gesamter Antigenmenge

L E B E N S L A U F

Am 3. Juli 1950 wurde ich als Sohn des Optikermeisters Georg Otto Schrezenmeir und seiner Frau Berta, geb. Flachenecker, in Wertingen bei Augsburg geboren.

Nach dem Umzug nach Bad Kissingen besuchte ich die dortige Volksschule von September 1956 bis 1961, anschließend das Gymnasium Bad Kissingen, wo ich am 20. Juni 1970 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1970 nahm ich in Würzburg das Medizinstudium auf, für dessen Dauer ich ein Hundhammer-Stipendium erhielt. Im Sommersemester 1971 bestand ich das Vorphysikum, im Wintersemester 1973 das Physikum und im Sommersemester 1976 das Staatsexamen.

Während der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich von Oktober bis Ende Dezember 1976 im Institut für Medizinische Strahlenkunde Würzburg, von Januar bis Ende April 1977 in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg und von Mai bis Ende September 1977 auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Diepholz.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 1. Oktober 1977 erteilt. Seitdem bin ich als wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg tätig.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führte ich am Institut für Medizinische Strahlenkunde im Zeitraum vom Sommersemester 1974 bis Frühjahr 1978 durch.

Jürgen Schrezenmeir

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80